

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática

Raquel Enma Hurtado Castillo

**EPIDEMIOLOGIA GENÔMICA E DETERMINANTES DA RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS DE *Salmonella* TYPHIMURIUM EM PERU**

Belo Horizonte
2022

Raquel Enma Hurtado Castillo

**EPIDEMIOLOGIA GENÔMICA E DETERMINANTES DA RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS DE *Salmonella* TYPHIMURIUM EM PERU**

Tese apresentada para a obtenção do Grau de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Bioinformática, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Dr. Vasco Azevedo

Coorientador:

Dr. Marcus Vinicius Canário Viana

Dr. Lenin Maturrano Hernández

Dr. Ronnie Gavilán Chavez

Belo Horizonte
2022

043

Castillo, Raquel Enma Hurtado.

Epidemiologia genômica e determinantes da resistência antimicrobiana de isolados de Salmonella Typhimurium em Peru [manuscrito] / Raquel Enma Hurtado Castillo. – 2022.

112 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador:Dr. Vasco Azevedo. Coorientador: Dr. Marcus Vinicius Canário Viana; Dr. Lenin Maturrano Hernández; Dr. Ronnie Gavilán Chavez.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática.

1. Bioinformática. 2. Resistência Microbiana a Medicamentos. 3. Salmonella typhimurium. 4. Doenças Transmitidas por Alimentos. 5. Vigilância em Saúde Pública. I. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho. II. Viana, Marcus Vinicius Canário. III. Hernández, Lenin Maturrano. IV. Chavez, Ronnie Gavilán. V. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. VI. Título.

CDU: 573:004



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática da UFMG

ATA DE DEFESA DE TESE

RAQUEL ENMA HURTADO CASTILLO

Às quatorze horas do dia **15 de dezembro de 2022**, reuniu-se, através de videoconferência, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Epidemiologia Genômica e Determinantes da Resistência Antimicrobiana de Isolados de *Salmonella Typhimurium* em Peru**", requisito para obtenção do grau de Doutora em **Bioinformática**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Professor(a)/Pesquisador(a)	Instituição	Indicação
Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - Orientador	Universidade Federal de Minas Gerais	Aprovada
Dr. Marcus Vinicius Canário Viana - Coorientador	Universidade Federal de Minas Gerais	Aprovada
Dr. Lenin Maturrano Hernández - Coorientador	National University of San Marcos	Aprovada
Dr. José Miguel Ortega	Universidade Federal de Minas Gerais	Aprovada
Dr. Wanderson Marques da Silva	Instituto de Agrobiotecnologia e Biologia Molecular	Aprovada
Dra. Elaine Maria Seles Dorneles	Universidade Federal de Lavras	Aprovada
Dr. Siomar de Castro Soares	Universidade Federal do Triângulo Mineiro	Aprovada
Dr. Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho	Universidade Federal da Bahia	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **Aprovada**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 15 de dezembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Siomar de Castro Soares, Usuário Externo**, em 15/12/2022, às 23:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcus Vinicius Canário Viana, Usuário Externo**, em 16/12/2022, às 09:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jose Miguel Ortega, Servidor(a)**, em 16/12/2022, às 10:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 16/12/2022, às 10:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho, Usuário Externo**, em 16/12/2022, às 12:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wanderson Marques Da Silva, Usuário Externo**, em 16/12/2022, às 14:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elaine Maria Seles Dorneles, Usuário Externo**, em 19/12/2022, às 08:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Abelardo Lenin Maturrano Hernández, Usuário Externo**, em 23/12/2022, às 13:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1944989** e o código CRC **492AAD1B**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática da UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Epidemiologia Genômica e Determinantes da Resistência Antimicrobiana de Isolados de *Salmonella Typhimurium* em Peru"

Raquel Enma Hurtado Castillo

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Marcus Vinicius Canário Viana - Coorientador
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Lenin Maturrano Hernández - Coorientador
National University of San Marcos

Prof. José Miguel Ortega
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Wanderson Marques da Silva
Instituto de Agrobiotecnologia e Biología Molecular

Profa Elaine Maria Seles Dorneles
Universidade Federal de Lavras

Prof. Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho
Universidade Federal da Bahia

Prof. Siomar de Castro Soares
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Belo Horizonte, 15 de dezembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Siomar de Castro Soares, Usuário Externo**, em 15/12/2022, às 23:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcus Vinicius Canário Viana, Usuário Externo**, em 16/12/2022, às 09:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jose Miguel Ortega, Servidor(a)**, em 16/12/2022, às 10:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 16/12/2022, às 10:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho, Usuário Externo**, em 16/12/2022, às 12:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wanderson Marques Da Silva, Usuário Externo**, em 16/12/2022, às 14:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elaine Maria Seles Dorneles, Usuário Externo**, em 19/12/2022, às 08:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Abelardo Lenin Maturrano Hernández, Usuário Externo**, em 23/12/2022, às 13:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1945011** e o código CRC **DDCC1EE1**.

AGRADECIMENTOS

Meu maior agradecimento à Universidade Federal de Minas Gerais e às instituições de fomento do Brasil que me permitiram desenvolver meu projeto e contribuir na minha formação acadêmica.

Agradeço ao professor Vasco Azevedo pela oportunidade, pelos desafios acadêmicos, e apoiar minha pesquisa e as colaborações.

Agradeço ao professor Dr. Lenin Maturrano pela confiança e apoio desde o ano 2012 e me encaminhar ao mundo da Genômica.

Agradeço ao professor Dr. Ronnie Gavilán pela confiança depositada e me dar a oportunidade de trabalhar com amostras clínicas.

Muito obrigada aos professores Debmalya Barh, Gerald Weber e Bart Weimer, pelos seus ensinamentos, discussões acadêmicas e suas contribuições para minha formação científica.

Muito obrigado a minha família, em especial a minha mãe Edma, por vir até o Brasil cuidar de mim e pelo seu imenso apoio, ao meu pai Florêncio, meus irmãos Nora e Ronal, agradeço seus conselhos, companhia e apoio. São minha maior referência de dedicação e esforço.

Muito obrigado aos meus amigos que me abriram seus corações, companhia, compreensão e seu carinho: Rose, Alessandra, Alfonso, Fenícia, Michel, Joyce, Mariana, Vinicius, Thais, Janaína, Mauricio; e um agradecimento especial as mentes brilhantes que encontrei no meu caminho, que me ajudaram e contribuíram no meu pensamento científico Glen, Luis, Victor, Gustavo, Gil e Meddly.

Aos meus amigos e colegas do LGCM que me acompanharam de perto e me ajudaram ao longo do meu projeto. Minha gratidão ao pessoal do Programa Sheila, Thiago e Natália que me ajudaram e facilitaram nas documentações.

Sou muito grata pelas pessoas com quem convivi durante estes 6 anos e me deixaram só ensinamentos, fico feliz de um dia ter decidido vir ao Brasil, só recebi aprendizado e sabedoria para a vida.

Mi naturaleza

“No reniego de mi naturaleza,
no reniego de mis elecciones,
de todos modos he sido una afortunada.
Muchas veces en el dolor se encuentran
los placeres más profundos,
las verdades más complejas,
la felicidad mas certera.
Tan absurdo y fugaz es nuestro
paso por el mundo,
que solo me deja tranquila
el saber que he sido auténtica,
que he logrado ser
lo más parecido a mi misma
que he podido.”

Frida Kahlo

RESUMO

A *Salmonella* Typhimurium está entre os principais sorovares causantes de doenças transmitidas por alimentos no Peru e no mundo. O alto registro epidemiológico de casos de gastroenterite, diarreia e surtos transmitidos por alimentos são influenciados pelas graves problemáticas no país como a falta de acesso à água potável, saneamento e deficiências no setor de alimentos. Em relação aos hospedeiros animais, porquinhos da Índia são um importante recurso nutricional e econômico para a região andina, porém são reservatórios do patógeno, e sua produção se vê afetada pelos altos índices de mortalidade por Salmonelose e uso não controlado do antibióticos. Em 2017, a Organização Mundial da Saúde adicionou *Salmonella* na lista de bactérias prioritários resistentes a antibióticos. Além disso, no Peru tem sido relatado um alto perfil de resistência antimicrobiana nos sorovares mais prevalentes, mas se desconhece as populações que estão circulando, e os mecanismos genéticos que estão associados à resistência antimicrobiana. Assim, este trabalho de Tese teve como objetivo contribuir com o sistema de vigilância genômica e fenotípica de *S. Typhimurium* no Peru provenientes na maioria de casos clínicos de diferentes cidades de Peru entre os anos 2000 e 2017. Em colaboração com Instituto Nacional de Saúde foi sequenciado 90 linhagens com a tecnologia Illumina e realizou-se em paralelo o teste de susceptibilidade antimicrobiana em disco de difusão para 10 antibióticos. A diversidade genética das linhagens peruanas foi obtida a partir da comparação nucleotídica, genes acessórios, filogenia e populacional com 46 globais genomas de *S. Typhimurium*. As análises de resistência antimicrobiana (AMR) foram realizadas com a predição de genes e mutações AMR, correspondência genótipo-fenótipo e análise de GWAS para a predição de novos determinantes genéticos. Ao menos 10 populações de diverso conteúdo de genes acessório que circulam no Peru, com duas populações clonais emergentes e três populações que contém um mosaico de plasmídeos transmissíveis contendo genes de resistência antimicrobiana. Além disso, pelo teste em disco de difusão foi identificada uma moderada resistência multidrogas a antibióticos da primeira linha, tais como ácido nalidíxico, ampicilina, tetraciclina com correspondência genotípica, exceto para nitrofurantoína. A análise genômica como preditora da resistência antimicrobiana foi inconclusiva devido aos baixos valores de sensibilidade. Por outro lado, seis linhagens de porquinho-da-Índia foram sequenciadas com Illumina e outros 20 genomas são públicos procedentes de alimentos e criação de porquinhos-da-Índia de Equador e Peru. A análise da diversidade, filogenia e cgMLST permitiu identificar ao menos 3 sub-populações (HC50_9757, HC50_67422, HC100_9460) circulando no Peru e uma população (HC100_41507) de isolados provenientes de alimentos do Equador, diferenciados pelo conteúdo de Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e genes. Das populações peruanas, identificamos, ainda, uma reduzida resistência associada a plasmídeos e sequências de inserção transmissíveis na população, e mutações em genes AMR associada a moderada resistência a ácido nalidíxico. Não foi possível identificar linhagens provenientes de porquinho-da-Índia de criação e alimentos pertencentes à mesma população ou compartilhando elementos de resistência transmissíveis. Conclui-se que existe uma resistência a antibióticos de primeira linha de reduzida a moderada e reduzida resistência a antibióticos atuais de tratamento. A resistência antimicrobiana é associada a plasmídeos, sequência de inserção, genes e populações circulando em humanos e criação de porquinhos da Índia. Estes estudos permitem promover a vigilância de locais reservatórios dos críticos sorovares de *Salmonella* e resistência antimicrobiana.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana, *Salmonella* Typhimurium, Sequenciamento genômico, Doenças transmitidas por alimentos, Vigilância na saúde pública.

ABSTRACT

Salmonella Typhimurium is among the main serovars causing foodborne illness in Peru and worldwide. The high epidemiological record of cases of gastroenteritis, diarrhea and outbreaks transmitted by food are influenced by severe problems in the country, such as lack of access to drinking water, sanitation and deficiencies in the food sector. Regarding animal hosts, guinea pigs are an important nutritional and economic resource for the Andean region. However, they are reservoirs of the pathogen, and their production is affected by high mortality rates due to Salmonellosis and uncontrolled use of antibiotics. In 2017, the World Health Organization added *Salmonella* to the list of priority antibiotic-resistant bacteria. In addition, in Peru, a high profile of antimicrobial resistance has been reported in the most prevalent serovars, but the populations that are circulating and the genetic mechanisms that are associated with antimicrobial resistance are unknown. Thus, this thesis work aimed to contribute to the genomic and phenotypic surveillance system of *S. Typhimurium* in Peru from most clinical cases from different cities in Peru between the years 2000 and 2017. In collaboration with the National Institute of Health, it was 90 strains sequenced using Illumina technology and antimicrobial susceptibility testing was carried out in parallel with diffusion discs for ten antibiotics. The Peruvian diversity was obtained by comparing nucleotide, accessory genes, phylogeny and population with 46 global genomes of *S. Typhimurium*. Antimicrobial resistance (AMR) analyses were carried out with the prediction of genes and AMR mutations present in the chromosome and plasmids, genotype-phenotype correspondence and GWAS analysis to predict new genetic determinants. At least ten populations of diverse content of accessory genes are circulating in Peru, with two emerging clonal populations and three populations containing a mosaic of transmissible plasmids containing antimicrobial resistance genes. In addition, the diffusion disk test identified moderate multidrug resistance to first-line antibiotics (nalidixic acid, ampicillin, tetracycline) with genotypic correspondence, except for nitrofurantoin. Genomic analysis as a predictor of antimicrobial resistance was inconclusive due to low sensitivity values.

On the other hand, six strains of *S. Typhimurium* were sequenced with Illumina for the analysis of guinea pig isolates, and another 20 genomes are public from food and breeding guinea pigs in Ecuador and Peru. Analysis of diversity, phylogeny and cgMLST identified at least three subpopulations (HC50_9757, HC50_67422, HC100_9460) circulating in Peru and a population (HC100_41507) of isolates from food in Ecuador, differentiated by the content of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) and genes. We also identified reduced resistance from the Peruvian populations associated with transmissible plasmids and insertion sequences and AMR mutation genes associated with moderate resistance to nalidixic acid. Identifying strains from guinea pigs for breeding and food belonging to the same population or sharing transmissible resistance elements was impossible. It is concluded that there is reduced to moderate resistance to first-line antibiotics and reduced resistance to current treatment antibiotics. Antimicrobial resistance is associated with plasmids, insertion sequence, genes and populations circulating in human and guinea pig husbandry. These studies allow promoting the surveillance of reservoir sites of critical *Salmonella* serovars and antimicrobial resistance.

Keywords: Antimicrobial Resistance, *Salmonella* Typhimurium, Genome Sequencing, Foodborne diseases, public health surveillance, Human food chain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de resistência antimicrobiana das bactérias gram-negativas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classes e mecanismos de ação dos antibióticos, adaptado de Kohansi (Kohanski et al., 2010).

LISTA DE ABREVIATURAS

ANI	Average Nucleotide Identity
ARB	Antibiotic resistant bacteria
AMR	Antimicrobial resistance
ARGs	Antibiotic resistance genes
AACs	AG N-acetiltransferase
AG	Aminoglicosídeo
ANTs	AG O-nucleotidil transferases
APHs	AG O-fosfotransferases
AM	Ampicillin
AMC	Amoxicillin-clavulanate
AMEs	Aminoglycosides Modify Enzymes
BHI	Brain Heart Infusion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Chloramphenicol
CAZ	Ceftazidima
CC	Complex Clonal
CDS	Coding Sequence
CFU	Colony forming units
cgMLST	core genome MLST
CIP	Ciprofloxacin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CTX	Cefotaxime
DNA	Deoxyribonucleic acid
DHFR	Dihydrofolate reductase
DHPS	Dihydropteroate synthase
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ESBL	Extended spectrum β -lactamase
FDA	Food and Drug Administration
GIs	Genomic islands
GWAS	Genome-Wide Association Studies
HGT	Horizontal Gene Transfer
HC	Hierarchical clustering
HierCC-cgMLST	Hierarchical clustering of <i>cgMLST</i>
ISs	Insertion Sequences
ICEs	Integrated conjugative elements
LD	Linkage disequilibrium
LPS	Lipopolysaccharides
MEs	Major errors
MDR	Multidrug resistance
MIC	Minimum inhibitory concentration
MCC	Matthews correlation coefficient
MGE	Mobile Genetic Element
MLST	Multilocus Sequence Typing
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next Generation Sequencing
NPV	Negative predictive value
NA	Nalidixic acid

N	Nitrofurantoin
NARMS	National Antimicrobial Resistance Monitoring System
NTS	Non-typhoidal Salmonella
ORF	Open Reading Frame
PCA	Principal component analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PABA	Para-aminobenzoic acid
PBP	Penicillin binding protein
PDR	Pandrug-resistant
PPV	Positive predictive value
PMQR	Plasmid-Mediated Quinolone Resistance
QRDR	Quinolone resistance-determining regions
16S rRNA	16S ribosomal ribonucleic acid
16S-RMTases	16S RNA metiltransferase ribossômica
SMC	Simple Matching Coefficient
RPPs	Ribosomal Protection Proteins
RND	Resistance-nodulation-division
RSV	Rappaport Vassiliadis Soya
SMZ	Sulfamethoxazole
SMR	Small multidrug resistance
SNVs	Single Nucleotide Variations
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenicity Island
SSA	Sub-Saharan Africa
ST	Sequence Type
SXT	Trimethoprim-sulfamethoxazole
VFDB	Virulence Factors Database
wgMLST	Whole Genomic Multilocus Sequence Typing
TE	Tetracycline
TMP	Trimethoprim
Tn	Transposons
TNR	True negative rate
TPR	True positive rate
TSA	Antimicrobial Susceptibility Testing
WHO	World Health Organization
WGS	Whole-Genome Sequencing
WGS-AST	Whole-Genome Sequencing for Antimicrobial Susceptibility Testing
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate
XDR	Extensively Drug Resistant

APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE TESE

1.1 A pesquisa sobre *Salmonella Typhimurium* e Colaborações

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) supervisionado pelo Prof. O Dr. Vasco Azevedo e Dr. Marcus Vinicius Canário Viana. Este trabalho teve o apoio financeiro das seguintes agências brasileiras: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

O capítulo I teve como finalidade a vigilância genômica e fenotípica da diversidade e resistência antimicrobiana de 90 isolados coletados de diferentes estados do Peru entre os anos 2000 e 2017. Em 2020 se dá início à colaboração com o Dr. Ronnie Gavilán, Diretor do Laboratório Nacional de Referencia de Enteropatógenos do Instituto Nacional de Salud (INS), localizado Peru, como parte do projeto “1000 genomas: filogeografia y estructura poblacional de *Salmonella enterica* en Perú, 1999 – 2017”. Esta Instituição se responsabiliza pela coleta das amostras das diferentes cidades do Peru, análise sorológicas, microbiológicas, teste em disco de difusão da resistência antimicrobiana e o sequenciamento das linhagens. O trabalho apresenta três filogrupos que possuem uma variedade de ao menos cuatro familias de plasmídeos resistentes e mutações cromossomais associados a resistência a antibióticos de primeira linha e de atual tratamento (cefalosporinas de espectro estendido, fluoroquinolonas, colistina e fosfomicina). O projeto resultou no artigo intitulado “**WGS-Based Lineage and Antimicrobial Resistance Pattern of *Salmonella Typhimurium* Isolated during 2000–2017 in Peru**” e exibido no Capítulo 1.

O capítulo II teve como finalidade investigar os grupos filogenéticos e determinantes de resistência antimicrobiana de isolados de *Salmonella Typhimurium* procedentes de porquinhos-da-Índia de criação. Em 2020 se inicia a colaboração do projeto com o Prof. Dr. Lenin Maturrano Hernández, Pesquisador e Professor da Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Seção de Biología Molecular e Genética da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), Peru. Este trabalho teve o apoio financeiro por Proyecto Concytec–Banco Mundial “Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica”, ProCiencia. A Instituição se responsabilizou pela coleta das amostras das granjas de porquinho-da-Índia, Lima, Peru, além das análises microbiológicas e moleculares. O sequenciamento dos isolados foi feito em colaboração com o Dr. Bertram Brenig do Institute of Veterinary Medicine, University of Göttingen, Germany. A contribuição deste trabalho permitiu conhecer o número e diversidade intra-inter populacional e a reduzida resistência antimicrobiana baseada na presença de conhecidos plasmídeos, sequências de inserção, genes e mutações associado a resistência a antibióticos na primeira linha de tratamento. O projeto resultou no artigo publicado no periódico Research in Microbiology intitulado “**The genomic approach of antimicrobial resistance of *Salmonella Typhimurium* isolates from guinea pigs in Lima, Peru**”, e exibido no Capítulo 2.

1.2 Estrutura da Tese

Este manuscrito é dividido em Introdução, Revisão Bibliográfica, Justificativa,

Objetivos, Resultados (Capítulo 1, Capítulo 2), Discussão Geral, Conclusões, Perspectivas, e Anexos;

A Revisão Bibliográfica aborda a biologia de *Salmonella* Typhimurium, conceitos e análises das áreas da genômica e resistência antimicrobiana;

O capítulo 1 apresenta a diversidade e resistência antimicrobiana circulando entre isolados de *Salmonella* Typhimurium procedentes de casos clínicos no Peru;

O capítulo 2 apresenta a diversidade e resistência antimicrobiana circulando entre isolados de *Salmonella* Typhimurium procedentes de porquinho-da -Índia;

A Discussão Geral integra resultados dos artigos apresentados;

O Anexo apresenta as linhas de comando utilizadas, resultados adicionais e demais atividades e produção científica desenvolvidas durante a tese.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 SALMONELLA ENTÉRICA	15
2.1.1 Taxonomia e microbiologia	15
2.1.2 Epidemiologia e patogenicidade	16
2.1.3 Tipificação e Filogenia do sorovar Typhimurium	17
2.2 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	19
2.2.1 Antibióticos e Mecanismos de resistência antimicrobiana	19
2.2.1.1 Betalactâmicos	21
2.2.1.2 Tetraciclina	22
2.2.1.3 Aminoglicosídeos	22
2.2.1.4 Fluoroquinolonas	23
2.2.1.5 Sulfonamidas e trimetoprim	23
2.2.1.6 Nitrofurantoína	24
2.2.2 Teste de susceptibilidade antimicrobiana	24
2.2.2.1 Teste de disco-difusão	25
2.2.2.2 Teste de concentração mínima inibitória (MIC)	25
2.2.3 Resistência antimicrobiana em Salmonella	25
2.3 ANÁLISES DE DIVERSIDADE GENÔMICA BACTERIANA	27
2.3.1 Polimorfismo de nucleotídeo único	29
2.3.2 Similaridade nucleotídica e tipagem	29
2.3.3 Estrutura populacional	30
2.3.4 Filogenética e filogenômica	30
2.3.5 Pangenômica.	31
2.3.6 Elementos Genéticos Móveis.	32
2.3.7 Banco de dados e ferramentas para a detecção de resistência antimicrobiana	32
2.3.8 Comparação entre perfis fenotípico e genotípico de AMR	33
2.3.9 Estudo de associação genômica ampla (GWAS) da AMR	35
2.4 VIGILÂNCIA GENÔMICA DA SALMONELOSE NO PERU	36
3 JUSTIFICATIVA	37
4 OBJETIVOS	38
4.1 OBJETIVOS GERAL	38
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
5 RESULTADOS	39
5.1 CAPÍTULO I - WGS-BASED LINAGE AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE PATTERN OF SALMONELLA TYPHIMURIUM ISOLATED DURING 2000–2017 IN PERU.	39
5.2 CAPÍTULO II- THE GENOMIC APPROACH OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF SALMONELLA TYPHIMURIUM ISOLATES FROM GUINEA PIGS IN LIMA, PERU	66

	13
6 DISCUSSÕES GERAIS	78
6.1 CAPÍTULO I	78
6.2 CAPÍTULO II	79
7 CONCLUSÕES	82
8 PERSPECTIVAS	83
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
10 ANEXO	94
- INFORME TÉCNICO	94
- RESULTADOS ADICIONAIS 1 -CAPÍTULO I	98
- RESULTADOS ADICIONAIS 2 -CAPÍTULO II	98
- RESULTADOS ADICIONAIS 3 -CAPÍTULO III	99
- PRODUÇÃO CIENTÍFICA	99
- FORMAÇÃO COMPLEMENTAR	103
- CURSOS MINISTRADOS	104
- RESUMOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS	104
- PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS	105

1 INTRODUÇÃO

Salmonella é um dos patógeno de grande importância para a saúde pública, devido a sua transmissão por meio do consumo de alimentos, ocasionando milhões de casos de diarreias, gastroenterites e surtos alimentares no Peru e ao redor do mundo (Kingsley et al., 2009; MINSA, 2019; X. Wang et al., 2019). Doenças transmitidas pelos alimentos são resultado de uma problemática grave no Peru, em decorrência que milhões de peruanos sofrem da falta de acesso à água, saneamento, e um deficiente controle sanitário no sistema de alimentos (Ramirez-Hernandez et al., 2020), incluindo aqueles obtidos desde o processo de criação caseiro até o intensivo, como é o caso dos porquinhos da Índia (Lilia Chauca, 1995; Matsuura S. et al., 2010).

O porquinho-da-Índia é um dos animais domésticos de alto valor nutricional e importância econômica nos países da região andina, sendo o Peru o maior produtor mundial. Porém, a produção dos porquinhos da Índia sofre limitações devido às inadequadas condições sanitárias de criação e a susceptibilidade à infecção por *Salmonella* (Lilia Chauca, 1995; Morales et al., 2007a). Existe um uso profilático e terapêutico indiscriminado dos antibióticos contra a salmonelose no sistema de produção de guinea pigs (Matsuura S. et al., 2010). Assim mesmo, a criação dos porquinhos da Índia atuam como reservatório potencial de bactérias resistentes a antibióticos na cadeia alimentícia (Huamán et al., 2020; Quesada et al., 2016). Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reportou a *Salmonella* na lista de patógenos de ameaça global pelo aumento de cepas multi-drogas resistentes, incluindo antibióticos da atual linha de tratamento (fluoroquinolonas e cefalosporinas de terceira geração) (World Health Organization. Regional Office for Europe, 2017).

Salmonella sorovar Typhimurium pertence ao grupo *Salmonella* não-tifóide (NTS), associado a casos de gastroenterites em humanos, e em casos graves pode causar uma infecção sistêmica (Gal-Mor, 2019). Nos casos de gastroenterite não se recomenda o tratamento com antibióticos, apesar disso, recentes trabalhos usando o teste de susceptibilidade antimicrobiana e genômica registram uma alta prevalência de cepas NTS e *S. Infantis* multidroga resistentes no Peru, incluindo resistência a antibióticos da atual linha de tratamento na maioria procedentes de amostras clínicas (Quino et al., 2019; Quino, Hurtado, et al., 2020).

Além disso, atualmente existe um reduzido número de trabalhos fenotípicos e moleculares dos isolados de *Salmonella* dos porquinhos da Índia, que apresentam uma variedade de grupos populacionais e alta resistência antimicrobiana (Guillermo et al., 2018;

Huamán et al., 2020). Porém, existe uma limitada vigilância genômica do patógeno *Salmonella* apesar do contínuo reporte de surtos alimentares e o incremento da resistência antimicrobiana pelo inadequado uso de antibióticos nos casos clínicos e de animais de produção (MINSA, 2019; Quesada et al., 2016; Ramirez-Hernandez et al., 2020). Nesse sentido, este trabalho propõe a vigilância genômica da resistência antimicrobiana de *S. Typhimurium* implicado na prevalência de doenças alimentares com o intuito de monitorar e caracterizar as populações, diversidade genética, evolução dos determinantes de resistência aos antibióticos de um dois críticos sorovares que circulam no Peru.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SALMONELLA ENTÉRICA

2.1.1 Taxonomia e microbiologia

Bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella* são Gram-negativas, cocobacilos, intracelulares facultativas, catalase positiva e oxidase negativa, com flagelos peritricosos, crescem a 37° C, e tem capacidade de produzir sulfeto de hidrogênio (R. Li et al., 2013).

Bactérias do gênero *Salmonella* são classificadas em duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, sendo a *S. enterica* subdivida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, e *indica*. Cada subespécie pode ser subdividida em vários sorovares, distinguidos pela composição dos antígenos O (Lipopolissacarídeo, somático), H (flagelo) e Vi (capsular), classificados de acordo com o sistema de Kauffman-White-Le (Guibourdenche et al., 2010).

A subespécie *S. enterica enterica* compreende a maior diversidade do gênero que inclui mais de 1.600 sorovares (Gal-Mor, 2019) e causa 99% das infecções em humanos e animais (Uzzau et al., 2000, p. 20). Do ponto de vista clínico, os sorovares podem ser classificados pela especificidade ao hospedeiro e a doença que causam. A maioria dos sorovares pertencentes a NTS tais como *Typhimurium* e *Enteritidis* são conhecidos como generalistas, devido a serem capazes de colonizar um amplo espectro de hospedeiros (por exemplo, porco, aves, porquinho-da-Índia), que atuam principalmente como reservatórios (Gal-Mor et al., 2014). Por outro lado, *Salmonella* tifóide inclui um subconjunto de sorovares conhecidos como restrito ao hospedeiro que causam uma infecção sistêmica, com os importantes sorovares *Typhi*, *Paratyphi B*, *Paratyphi* (em humanos); e *Gallinarum* e *Pullorum*

(em aves). Um terceiro grupo seriam os sorovares Choleraesuis e Dublin, os quais são adaptados a porco e bovino, respectivamente; e causam esporadicamente infecções sistêmicas em humanos (Gal-Mor, 2019).

2.1.2 Epidemiologia e patogenicidade

Salmonella é o principal patógeno causador de doenças em humanos e animais de produção. As infecções podem ser agudas ou sistêmicas, ocasionando morbidade e mortalidade ao redor do mundo. *S. enterica* subsp. *enterica* infecta humanos através da rota oral-fecal e é transmitida principalmente pelo consumo de alimentos derivados de animais (exemplo aves, ovos, porco) e águas contaminadas (Eng et al., 2015). Em humanos, pode-se classificar a doença em Salmonelose não-tifóide e Salmonelose tifóide ou febre tifóide. Estima-se cerca de 1,3 bilhão de casos por ano de gastroenterites e cerca 3 milhões de mortes globalmente derivados da Salmonelose não-tifóide (Kurtz et al., 2017), sendo a maioria dos casos de países em desenvolvimento. Os sintomas da gastroenterite aparece de 4 a 72 horas após a infecção, sendo que os principais sintomas incluem febre, calafrios, náuseas, vômitos, câibras abdominais e diarreia durante 3 a 7 dias, sem a necessidade de intervenção médica (Gal-Mor et al., 2014). Adicionalmente recentemente se reporta Salmonelose não tifóide invasiva, associado principalmente à dominantes clones de *S. Typhimurium* e ST313 procedentes de África e em expansão global (Haselbeck et al., 2017).

Além de humanos, a Salmonelose é uma das principais causas de morte e doença em animais de produção, como bovinos, aves, gatos, cavalos, cachorros e porquinhos-da-índia. Os principais sorovares causantes de infecções em bovinos são o *S. Dublin* e o *S. Typhimurium*. Por sua vez, as aves são infectadas principalmente por *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, os porcos por *S. Choleraesuis* e *S. Typhimurium* e cavalos, cachorros e gatos por *S. Typhimurium*.

A Salmonelose no porquinhos-da-índia é causada principalmente pelo sorovar *Typhimurium*, a via da transmissão é oral-fecal e as fontes da infecção são os animais doentes, animais portadores sadios, água e alimentos contaminados e o ambiente de criação. Sinais clínicos se manifestam de forma aguda ou crônica. No quadro septicêmico agudo, a *Salmonella* causa morte entre 24 e 48 horas, apresentando um alto índice de mortalidade (95%) e morbidade (0,9 a 53%). Nos casos crônicos causa caquexia, anorexia, diarreia, neumonia, abortos, abdômem inchado e pele sem brilho (Morales et al., 2007b).

A infecção por *Salmonella* é baseada em sua capacidade de invadir, replicar e permanecer no hospedeiro. A gravidade pode depender do sorotipo e estado de saúde do hospedeiro. *Salmonella* produz diferentes fatores de virulência, envolvidos na invasão, revestimento da parede, sobrevivência intracelular e secreção de toxinas (Bhat et al., 2022). Ao menos 18 ilhas de patogenicidade codificantes de fatores de virulência foram identificadas em *Salmonella* (Kombade & Kaur, 2021).

Para causar infecção, uma vez ingerida, *Salmonella* coloniza o epitélio intestinal. Na superfície das células não fagocíticas há a presença de receptores específicos que reconhecem o micro-organismo causando uma invasão ativa. Este mecanismo é chamado de ‘trigger’ e consiste no uso do sistema de secreção tipo III e a injeção de proteínas efetoras, as quais permitem o reordenamento do citoesqueleto e ruffling da membrana até a internalização da bactéria (Sánchez & Cardona, 2003). A invasão, por sua vez, induz resposta do tipo Th1 e o recrutamento de células fagocíticas, como neutrófilos, macrófagos, e o recrutamento de células T e B, que limitam a disseminação de NTS. A liberação de citocinas induzem uma resposta inflamatória, que se manifesta em frequentes sintomas como diarreia (Tükel et al., 2006).

Nas infecções extraintestinais, a bactéria cruza a mucosa intestinal via células dendríticas por fagocitoses, sem causar uma resposta inflamatória, ganhando acesso a tecidos linfóides e sanguíneos, nos quais proliferam intracelularmente dentro de vacúolos nos fagócitos. Além disso, se disseminam sistematicamente (principalmente para o fígado, baço e nódulos linfáticos) (Gal-Mor, 2019).

2. 1.3 Tipificação e Filogenia do sorovar Typhimurium

Nas NTS, o sorovar Typhimurium infecta um amplo espectro de hospedeiros com uma variedade de graus de adaptação. É um agente causador de gastroenterite e que em menor frequência pode se disseminar e acometer o intestino, o sistema sanguíneo e linfático e causar uma infecção sistêmica (Kingsley et al., 2009). Os sorovares mais prevalentes ao redor do mundo são Typhimurium, Enteritidis, Infantis e Newport, porém a presença e prevalência varia no tempo e por local de isolamento.

Entre 2007 e 2011, o sorovar Typhimurium foi o mais prevalente nos Estados Unidos, Canadá, Austrália e Nova Zelândia, e o segundo mais prevalente na África, Ásia, Europa e América Latina (Hendriksen et al., 2011). Um sistema de tipagem de sorovar permite a subclassificação baseado na resposta lítica contra categorias de fagos, ajudando no registro de

subtipos disseminados no tempo (Branchu et al., 2018). Um exemplo é a disseminação global do grupo clonal DT104 multidrogas resistente (MDR) durante os anos 90 (Helms et al., 2005). Somado a isto, existem outras estratégias de subclassificação do sorovar baseado na diversidade genotípica, como Tipagem de Sequência Multilocus (MLST) e análises mais exaustivas baseadas no genoma, como core genoma MLST (cgMLST), polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e filogenéticas (Achtman, 2008; Maiden et al., 2013; Pearce et al., 2018).

A análise filogenética baseada em SNPs, entre linhagens de sorovares da subespécie entérica, mostra Typhimurium como um dos sorovares mais ancestrais e com uma acumulação entre 20.000 e 40.000 SNPs divergentes de outros sorovares (Branchu et al., 2018). Outra análise filogenética entre linhagens do sorovar Typhimurium, com exceção de linhagens pertencentes a ST36, mostra a presença de dois grandes sub clados (alfa e beta) e múltiplos ramos curtos, o que sugere expansões clonais e uma diversidade nucleotídica entre 400 a 600 SNPs (Id et al., 2020; Kingsley et al., 2009). Além disso, o sorovar Typhimurium possui mais de 20 sequências tipo pertencentes ao sistema MLST, com exceção de algumas Sequência tipo (ST) que podem ser discriminadas em subclados discretos. A maioria dos isolados pertencentes à sequência tipo ST19 apresenta uma considerável diversidade comparada a outros STs e é uma das mais ancestrais dentro do sorovar (Branchu et al., 2018). A emergente sequência tipo ST313 surgiu na África subsaariana, ligada a cepas multidrogas resistentes e causadoras de doenças sistêmicas (Kingsley et al., 2009). Análises mais exaustivas identificaram a presença de patovariantes dentro deste sorovar pela presença de alguns clados filogenéticos e subtipos de fagos altamente adaptados a um hospedeiro, distinção da patogenicidade e risco da segurança alimentar (Branchu et al., 2018; Id et al., 2020; Zhang et al., 2019), permitindo discriminar entre grupos clonais dominantes (phage types DT9,DT204/49 complex, DT104, *S.* 4,[5],12:i:-) e subtipos (DT8, DT2 e DT56) adaptados a pássaros silvestres (Branchu et al., 2018). Análises de estruturação populacional e filogenética do sorovar Typhimurium permitem distingui-lo em dois grandes clados e vários subclados, por padrões genéticos e submetidos à seleção antropogênica. O clado beta apresenta múltiplos subclados associados principalmente com aves selvagens. Por sua vez, no clado alfa se encontram recentes expansões clonais e a distinção de clados associados a animais agropecuários (Branchu et al., 2018; Id et al., 2020).

2.2 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

2.2.1 Antibióticos e Mecanismos de resistência antimicrobiana

Os antibióticos são moléculas de baixa massa molecular e quando administradas em uma baixa concentração são capazes de inibir o crescimento (ação bacteriostática) ou matar (ação bactericida) microorganismos (Kohanski et al., 2010). O primeiro antibiótico natural foi descoberto por Fleming em 1928, a partir de uma placa de Petri contendo uma cultura de *Staphylococcus* contaminada com um esporo de fungo *Penicillium*, sendo posteriormente usado terapêuticamente a partir de 1940 (Gaynes, 2017). Desde então, a ocorrência de bactérias resistentes aos antibióticos ocorreu sucessivamente com a descoberta dos antibióticos.

A resistência a antibióticos é um problema de saúde pública ao redor do mundo, devido às limitações no tratamento, incremento do custo no tratamento e a mortalidade (Cosgrove, 2006). De acordo com um relatório apresentado pelo governo do Reino Unido em 2014, estima-se que em 2050, 10 milhões de pessoas morrerão a cada ano, devido à resistência antimicrobiana. Em 2017, a OMS publicou uma lista de prioridade de bactérias com resistência antimicrobiana que representam a maior ameaça à saúde humana. A lista compreende 12 famílias de bactérias, e inclui o gênero *Salmonella* e sua resistência a fluoroquinolona e cefalosporinas de terceira geração.

A resistência intrínseca é a habilidade inata da bactéria a resistir a ação dos antimicrobianos. Na resistência adquirida, a bactéria adquire elementos genéticos que são mantidos sob pressão seletiva e permite uma tolerância ao antibiótico. Bactérias adquirem resistência através das mutações ou aquisição de determinantes genéticos externos (plasmídeos, transposons, e outros) usando qualquer dos mecanismos de conjugação, transformação e transdução (Wright, 2010). As bactérias podem se tornar resistentes aos antibióticos usando uma ou todas as seguintes vias: a. Mudança na permeabilidade da parede celular bacteriana, b. Uso de bombas de efluxo, c. Modificação do alvo antimicrobiano, d. Degradação enzimática/inativação de antimicrobianos, e. Proteção do alvo (Figura 1; Tabela 1). Do universo de antibióticos e os mecanismos de resistência bacteriana serão detalhados um subconjunto de antibióticos que são rotineiramente usados no teste de susceptibilidade pelo Instituto Nacional de Saúde do Peru e que também são incluídos historicamente na resistência antimicrobiana de *Salmonella* (Mensah, 2019).

Tabela 1. Classes e mecanismos de ação dos antibióticos, adaptado de Kohansi et al. (Kohanski et al., 2010).

Antibiótico	Classes dos antibióticos	Mecanismo de ação
Penicilina (Amoxicilina, ampicilina)		
Cefalosporina (Cefotaxime, Ceftazidime, Ceftriaxone)	Betalactâmicos	Interferência na síntese da parede celular
Carbapenemos		
Vancomicina	Glicopeptídeos	
Colistina	Polimixina	Disrupção da estrutura da membrana
Tetraciclina, doxiciclina	Tetraciclina	
Estreptomicina, gentamicina	Aminoglicosídeo	Inibição da síntese de proteínas
Cloranfenicol	Anfenicóis	
Azitromicina, eritromicina	macrolídeo	
Ácido nalidixico, ciprofloxacino, enrofloxacino	Fluoroquinolona	Interferência da síntese de ácido nucleico
Trimetoprima-sulfametoxazol	Sulfonamida	Inibição de vias metabólicas
Nitrofurantoína	Nitrofurantoína	

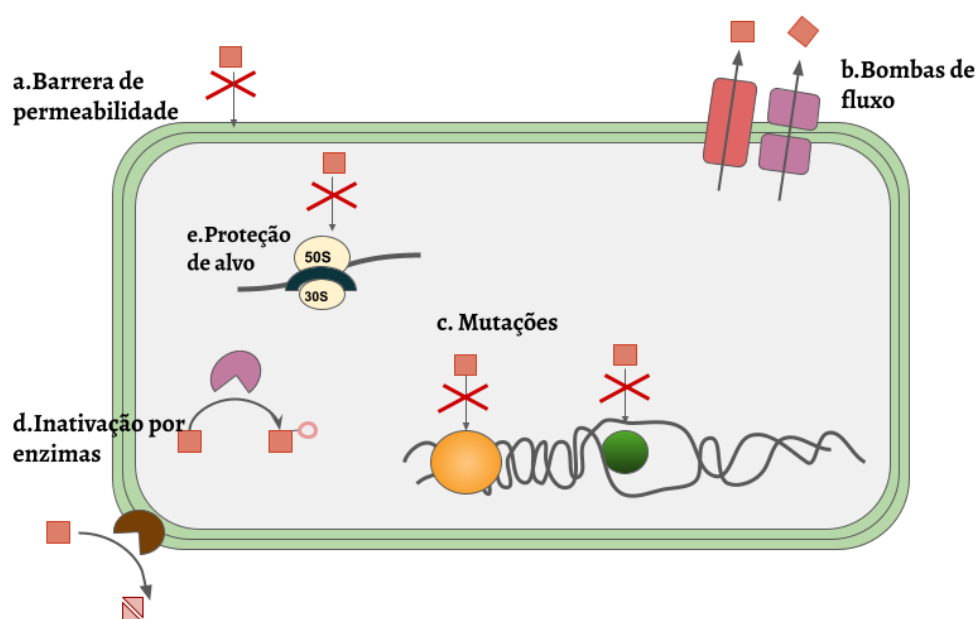


Figura 1. Mecanismos de resistência antimicrobiana em bactérias Gram-negativas. (adaptado por Allen et al. (Allen, 2010).

2. 2.1.1 Betalactâmicos

A superfamília de betalactâmicos apresenta uma mesma estrutura central do anel beta-lactâmico em 4 subgrupos (penicilina, cefalosporina, carbapenêmicos e monobactâmicos) (Zango et al., 2019). Este anel mimetiza a forma terminal do peptídeo D-Ala-D-Ala, que serve como substrato da família de enzimas de proteína de união, a penicilina (PBP), responsáveis pela união covalente entre cadeias de peptidoglicano da parede celular bacteriana. O antibiótico betalactâmico forma um complexo acyl-enzima com PBPs e inibe a atividade da transpeptidase na síntese da parede celular (Worthington & Melander, 2013).

Existem 4 mecanismos para evadir o efeito bactericida dos betalactâmicos: (1) Mutações podem acontecer no sítio PBPs e exibir uma menor afinidade com os betalactâmicos; (2) Diminuição ou falta de expressão de proteínas de membrana externa de natureza intrínseca das bactérias Gram-negativas; (3) As bombas de efluxo, que fazem parte da resistência intrínseca ou adquirida; (4) Produção de betalactamase que hidrolisa o aro betalactâmico e este passa a ser inativado antes de unir-se ao alvo PBPs. Os genes codificantes das betalactamases estão presentes no cromossomo e nos elementos móveis (ex., *blaTEM-1*, *blaTEM-2* e *blaSHV-1*) (Poole, 2004). Mais de 530 betalactamases foram

reportadas, sendo as mais preocupantes, as β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), AmpC β -lactamases e as carbapenemases (Zango et al., 2019).

2.2.1.2 Tetraciclina

Tetraciclina é um antibiótico bacteriostático, interferindo na síntese de proteínas. O antibiótico atua por meio de sua ligação ao ribossomo, e interação com o RNA ribossomal na subunidade ribossomal 30S, e interferindo estericamente com o encaixe do tRNA durante o alongamento. Quatro diferentes mecanismos específicos de resistência à tetraciclina foram identificados: mutação no sítio alvo, proteção ribossomal específica, bombas de efluxo, e produção de enzimas de inativação de tetraciclina. Uma variedade de mutações no sítio alvo que afetam a união com a tetraciclina foram reportadas nos genes 16S RNA, *rpsJ* (proteína S10 da subunidade ribossomal 30S) e *rpsC* (proteína S3 da subunidade ribossomal 30S) em várias bactérias incluindo *K. pneumoniae* (Grossman, 2016). Para limitar o acesso de tetraciclina nos ribossomos, são reportadas proteínas de proteção ao ribossomo (RPPs), os mais caracterizados são *tet0* e *tetM* (Dönhöfer et al., 2012; Kobayashi et al., 2007). Proteínas TetA e TetB são as bombas de tetraciclina mais comumente encontradas em isolados clínicos Gram-negativos (Grossman, 2016).

2.2.1.3 Aminoglicosídeos

O aminoglicosídeo (AG) atua via ligação ao sítio A do 16S rRNA na subunidade 30S ribossomal e interfere na tradução de proteínas, conduzindo à morte bacteriana (Garneau-Tsodikova & Labby, 2016). Os aminoglicosídeos são usados contra bactérias Gram-negativas e algumas Gram-positivas.

Os principais mecanismos da resistência aos aminoglicosídeos são: (1) a barreira intrínseca da parede celular, (2) presença de bombas de efluxo, (3) mutações no ribossomo, (4) modificação do ribossomo pela enzima glicosiltransferase, e (5) inativação por enzimas que modificam aminoglicosídeos (AMEs). O mecanismo mais comum de resistência é a presença de AMEs em 3 subclasses: AG N-acetiltransferase (AACs), AG O-nucleotidil transferases (ANTs), e AG O-fosfotransferases (APHs) (Ramirez & Tolmasky, 2010).

2.2.1.4 Fluoroquinolonas

A primeira quinolona é o antibiótico ácido nalidíxico; alterações nas quinolonas resultam nas fluoroquinolonas, antibióticos de amplo espectro, devido ao aumento na capacidade de penetração da parede e melhor atividade contra diversas infecções bacterianas. Destes, o mais comum de uso clínico é o ciprofloxacino. Por sua vez, o mais usado nos animais de produção é o enrofloxacino (Lysnyansky et al., 2013). O mecanismo de resistência à fluoroquinolonas é a inativação da topoisomerase II (DNA girase) e topoisomerase IV. Estas enzimas são responsáveis pela manutenção da estrutura terciária do DNA durante a síntese, replicação, condensação de DNA entre outros eventos, que induzem a uma quebra do DNA e morte celular (Ashley et al., 2017; Reece et al., 1991).

Existem três mecanismos bacterianos de resistência a quinolonas: (1) mutações cromossômicas em genes codificadores, (2) mutações associadas à redução da concentração intracitoplasmática de quinolonas e (3) genes de resistência às quinolonas mediados por plasmídeos (Hooper & Jacoby, 2015). A resistência a quinolonas se deve a mutações nos aminoácidos do domínio QRDR em ambos GyrA-ParC e GyrB-ParE, os quais favorecem uma diminuição da afinidade na ligação das quinolonas com a DNA-DNA girase e DNA-topoisomerase IV. Outro mecanismo de resistência a quinolonas é a habilidade de diminuir a concentração intracitoplasmática do antibiótico, mediada por mutações na região cromossomal codificante das bombas de efluxo. Genes de resistência a quinolonas mediados por plasmídeos são proteínas da família repetida pentapeptídeo que protege a DNA girase e topoisomerase da inibição de quinolonas, entre eles os genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, e *qnrVC* (Georgina Solano-Gálvez et al., 2021; Tran & Jacoby, 2002). Resistência a quinolonas pode ser mediada também pela ação enzimática de uma glicosiltransferase aminoglicosidase (AAC(6')-Ib-cr). Adicionalmente, bombas de efluxo de quinolona adquiridas por plasmídeos são QepA e OqxAB (Georgina Solano-Gálvez et al., 2021).

2.2.1.5 Sulfonamidas e trimetoprim

O uso combinado do trimetoprim (TMP) e sulfonamida apresentam um efeito sinérgico, em razão de ambas as drogas afetarem a síntese do ácido fólico (Bushby & Hitchings, 1968) requerido para o crescimento bacteriano. As sulfonamidas inibem a diidropteroato sintase (DHPS), que catalisa a formação de diidrofolato a partir do ácido para-aminobenzóico. Na etapa subsequente da via, o TMP inibe a diidrofolato redutase (DHFR), que catalisa a formação de tetraidrofolato a partir do diidrofolato. A combinação das 2 drogas apresentou um maior espectro bacteriostático.

A resistência bacteriana a TMP e a sulfonamidas é mediada por 5 mecanismos: (1) barreira de permeabilidade e/ou bombas de fluxo, (2) enzimas naturalmente insensíveis, (3) mudanças regulatórias nas enzimas alvo, (4) mutações ou recombinações nas enzimas e (5) resistência adquirida por enzimas resistentes a drogas. A resistência transferível à TMP é definida prevalentemente pelos genes *dhfrI* e *dhfrII* (Adrian et al., 1998). Na resistência à sulfonamida, foram identificadas mutações no gene cromossomal *dhps* (*folP*) e a transferência das enzimas DHPS codificadas pelos genes *sulII* e *sulIII* (Sköld, 2000).

2.2.1.6 Nitrofurantoína

O mecanismo de ação do antibiótico é ainda desconhecido. O mecanismo de resistência sugere duas categorias de atividade redutora ao antibiótico: um tipo insensível ao oxigênio e outro inibido por oxigênio. A resistência é atribuída a mutações nos genes cromossomais, nos genes *nfsA* e *nfsB* codificantes de nitroreductase. A resistência à nitrofurantoína também pode ser codificada no plasmídeo (Sandegren et al., 2008) com a presença dos genes *oqxAB*, codificando uma bomba de efluxo do tipo Divisão de nodulação de Resistência (RND) (Hansen et al., 2007).

2.2.2 Teste de susceptibilidade antimicrobiana

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (AST) é realizado por laboratórios microbiológicos para confirmar a susceptibilidade ou resistência a um antibiótico, baseado na inibição do crescimento bacteriano. O resultado permite orientar a terapia clínica e monitorar AMR ao longo do tempo (Jorgensen & Ferraro, 2009). O AST segue um protocolo padronizado para garantir resultados reprodutíveis e confiáveis (Balouiri et al., 2016), conforme os comitês internacionais, incluindo o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) ou o Comitê europeu de Testes de Susceptibilidade a Antimicrobianos (EUCAST). Ambos proporcionam critérios para seguir estritamente os protocolos, entre eles o meio de crescimento, concentração do antibiótico, concentração da inoculação, tempo de incubação, temperatura, e critérios para interpretar os resultados (Balouiri et al., 2016). Os diversos métodos estão categorizados pela técnica de difusão ou diluição do antibiótico.

2.2.2.1 Teste de disco-difusão

Para realizar o teste, se prepara uma solução fresca com as bactérias seguindo a escala do McFarland de 0,5 (1.5×10^8 CFU/mL). O inóculo é varrido na superfície da placa que

contém 4 mm de ágar Mueller-Hinton. Depois disso, o disco do antibiótico ou a tira gradiente são impregnados na placa e incubados em determinada temperatura e tempo, a depender do tipo de microorganismo. O antibiótico se difunde no ágar radialmente, criando um gradiente de concentração circundando o disco e diminuindo para fora. As bactérias crescem apenas até a concentração máxima de antibiótico que podem tolerar, resultando em uma zona de inibição. O diâmetro da zona inibitória é medido em milímetros usando uma régua e é interpretado conforme os critérios do CLSI ou EUCAST (CLSI, 2021; EUCAST, 2021). Os resultados obtidos são qualitativos e descrevem os isolados bacterianos categoricamente como suscetíveis, intermediários ou resistentes ao antibiótico testado. Esta técnica é a mais simples e com o melhor custo-benefício para triagem em laboratórios de diagnóstico (Jorgensen & Ferraro, 2009).

2.2.2.2 Teste de concentração mínima inibitória (MIC)

A diluição do caldo consiste em uma série de concentrações de antibióticos preparadas em caldo Mueller-Hinton. Esta técnica pode ser realizada em tubos grandes (macrodiluição) ou em placas de microtitulação (microdiluição). A microdiluição em caldo é um teste prático e popular sendo o mais utilizado em laboratórios de diagnóstico. Um inóculo de concentração final $5,0 \times 10^5$ CFU/ml é adicionado ao caldo contido em placas de microtitulação de 96 poços (CLSI, 2021; Jorgensen & Ferraro, 2009). A avaliação da susceptibilidade ao antibiótico está baseada na falta de turbidez que indica a inibição do crescimento bacteriano e o valor do MIC, que pode ser interpretado usando um manual ou um dispositivo de visualização automatizado.

2.2.3 Resistência antimicrobiana em *Salmonella*

Deve-se destacar que casos de gastroenterite por *Salmonella* não tifóide não recebem comumente tratamento com antibióticos, contrariamente às infecções sistêmicas (febre tifóide). *S. Typhi* do grupo de *Salmonella* Tifóide historicamente apresentam resistência a antibióticos de primeira linha tais como ampicilina, cloranfenicol e trimetoprim-sulfametoxazol (Marchello et al., 2020). Assim mesmo, em diversos países incluindo Pakistan se tem registrado *S. Typhi* classificadas como extensivamente resistentes (XDR) aos antibióticos fluoroquinolonas e cefalosporinas de terceira geração (E. J. Klemm et al., 2018; Marchello et al., 2020) e também se registram resistência a antibióticos alternativos

(macrolídeos e carbapenêmicos) (Crump et al., 2015). Diante a isso, a OMS declara ao gênero *Salmonella* como uma ameaça global. A vigilância em NTS deu-se, principalmente, devido à emergência da cepa *S. Typhimurium* DT104 MDR disseminada nos Estados Unidos a partir dos anos 90 (Helms et al., 2005). De 975 linhagens, 275 (28%) foram de *S. Typhimurium* isoladas de humanos nos Estados Unidos em 1995, que apresentaram perfil de resistência à ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina.

Posteriormente, um estudo de AMR usando sequenciamento do genoma completo para teste de suscetibilidade antimicrobiana (WGS-AST) em 3.491 isolados de NTS recebidos pela Unidade de Referência de Bactérias Gastrointestinais da Saúde Pública na Inglaterra entre 2014 e 2015, reportou 2.190 isolados (62,73%) pan-sensíveis. No entanto, foram observadas cepas MDR com uma maior frequência de resistência a tetraciclina (26,27%, 917), sulfonamidas (23,72%, 828) e ampicilina (21,43%, 748), seguidos de cefalosporinas (1,17%, 41) e ciprofloxacino (2,35%, 82) (Neuert et al., 2018).

Uma análise sistemática em 53 estudos de NTS invasivas na África subsariana entre 1990 e 2019, demonstrou que desde 2001, 75% dos isolados são MDR (ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprima e cloranfenicol). Cefalosporina de terceira geração e fluoroquinolona foram usadas como tratamento terapêutico, porém foram relatadas cepas resistentes. Nesta condição, azitromicina e carbapenêmicos são usados como tratamento alternativo (Tack et al., 2020).

Outro estudo coletou 11.447 linhagens de *S. Typhimurium* da cadeia alimentícia (homem, animais, alimentos) entre 1996 e 2016 nos Estados Unidos e realizou o MIC para 27 antibióticos. Os padrões de resistência aos antibióticos mais frequentemente observados (43%) foram a ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas, tetraciclina e cloranfenicol (X. Wang et al., 2019). Assim, mesmo na África subsaariana, *S. Typhimurium* ST313 MDR foi uma linhagem dominante que exibe resistência a cefalosporinas e azitromicina (Van Puyvelde et al., 2019). No estudo sistemático por Quesada et al. (Quesada et al., 2016), isolados de *Salmonella* spp procedentes de alimentos de origem animal, apresentaram, prevalentemente, resistência a ácido nalidíxico, ampicilina, tetraciclina e cloranfenicol, além de susceptibilidade a ciprofloxacina e ceftriaxona.

No Peru, por exemplo, Silva et al. (2017) realizaram um estudo de 90 isolados de *S. enterica* de casos de bacteremia em Lima, e reportaram que 74% das linhagens foram susceptíveis e 37% apresentaram resistência intermediária à ciprofloxacino (Silva et al., 2017). Posteriormente, Quino et al. (2020) avaliaram 540 isolados de *S. enterica* aislados maioritariamente de humanos entre os anos de 2012 e 2015, 6% foram de *S. Typhimurium*.

Os autores observaram alta resistência à nitrofurantoína (74%), ácido nalidíxico (64%), ciprofloxacina (63%), tetraciclina (63%), ampicilina (56%), cotrimoxazol (56%), cefotaxima (53%) e cloranfenicol (50%) (Quino, Hurtado, et al., 2020). É interessante ressaltar que animais de criação como frango, porco e porquinho-da-Índia, seriam os maiores reservatórios do patógeno *Salmonella* na América Latina (Quesada et al., 2016). Os únicos relatos do perfil antimicrobiano de 148 linhagens de *S. enterica* isoladas de carne de cerdo apresenta uma alta resistência a antibióticos como tetraciclina (100%), chloramphenicol (90%), nitrofurantoína (80%), amoxicilina (50%) e susceptibilidade a ciprofloxacino (Ríos C et al., 2019).

Matsuura et al. (2010) estudaram a susceptibilidade antimicrobiana em isolados de *S. enterica* de porquinho-da-Índia de criação na cidade de Ancash e observaram susceptibilidade a maioria dos antibióticos incluindo enrofloxacino, sulfatrimetoprim, estreptomicina e amoxicilina, cloranfenicol e gentamicina (Matsuura S. et al., 2010). Porém recentemente, Huamán et al. (2020) reportaram cepas multidrogas resistentes (25%), resistência à eritromicina (60%), nitrofurantoína (40%), estreptomicina (30%), penicilina (25%) e enrofloxacina (10%) em 20 isolados de porquinho-da-Índia de criação (Huamán et al., 2020).

2.3 ANÁLISES DE DIVERSIDADE GENÔMICA BACTERIANA

Com a contínua melhora nas tecnologias de sequenciamento e seu reduzido custo, existe uma enorme quantidade de genomas sequenciados representando uma espécie, população ou grupo amostral. Permitindo uma melhor resolução da diversidade e ancestralidade do táxon, já seja desde a variação de um só nucleotídeo até o conteúdo de genes repertório (Loman & Pallen, 2015). O chamado de variantes polimórfica preferentemente permite diferenciar entre linhagens monomórficas (Parkhill et al., 2001) e a predição das famílias de genes ortólogos discriminaria as bactérias de alta plasticidade genômica (McInerney et al., 2017). As estratégias da genômica comparativa e a metadata (região geográfica, origem, estado clínico, anos) permite um melhor conhecimento da estrutura populacional, evolução, adaptação, patogênese, e dinâmica no tempo do microorganismo (Bentley & Parkhill, 2015). Assim mesmo a genômica permite uma melhor caracterização do agente infeccioso, complementar às técnicas tradicionais (bioquímicas, microbiológicas, serológicas e teste de susceptibilidade antimicrobiana (Bentley & Parkhill, 2015). Estratégias usando todo o genoma tem ajudado a sorotipificação de *Salmonella*, e subclassificação dos sorovares baseado na sequência tipo baseado em sete genes *housekeeping* (MLST) e baseado nos genes core (cg-MLST) (Christensen & Olsen, 2018; Zhou et al.,

2020). Baseado nas estratégias de caracterização genômica, filogenia e chamado de nucleotídeos polimórficos permite dilucidar a diversidade, ancestralidade e determinantes de virulência no patógeno. Zhang et al. examinou características genômicas em *S. Typhimurium* e sua adaptação a animais de consumo, com o uso do aprendizado de máquina se identificou 50 genes chaves indicadores da origem e baseado na filogenia se detectou ao menos 10 grupos filogenéticos associados a surtos alimentares e adaptação ao hospedeiro (Zhang et al., 2019). Assim mesmo, análise WGS permite o monitoramento epidemiológico de bactérias multirresistentes, virulência e controle da infecção. Análise genômico reportou a emergência de o sublinage ST313 II.1 MDR associado a infecções invasivas não tifoide na África subsariana, e extensivamente droga resistente (*catA*, *blaTEM1*, *dfxA*), incluindo betalactamase de espectro estendido, resistência à azitromicina (*blaSHV-2A*, *mphA*), redução da susceptibilidade a ciprofloxacino (*gyrA* (D87N), *qnrS*). Além disso a sublinagem carregava o plasmídeo IncHI2 e sinais genéticas associadas a adaptação e patogenicidade, como a perda do gene flagelina *fljB* e 19 substituições não sinônimas em domínios conservados de proteínas, associados a adaptação ao hospedeiro (*cbiH*), virulência (*asmA*, *trg_1*) entre outros genes (Van Puyvelde et al., 2019). No estudo da evolução de *S. Typhimurium*, a filogenia e estruturação populacional identificou ao menos dois grandes cluster (α & β) e 18 sub-clusters distinguidos por adaptação ao hospedeiro e seleção antropogênica. Linhagens de surtos em animais de produção (bovino, porco, aves) pertencem ao clado alfa e altos níveis de enraizamento de subclados B pertencem isolados adaptados aves silvestres com algumas exceções. Além disso se identificou uma maior presença de genes AMR em subclados ST313 and U288 carregando o replicon IncQ1 em animais de produção e que estão sometidos a seleção antropogênica. Dos análise pangenoma mostra uma alta variabilidade intraespecífica e sua distribuição distinguida por subclados, existindo maior fluxo de genes profagos, entre eles intrínsecos profagos com alta taxa de recombinação (BcepMu, Gifsy1, Gifsy2, Fels1) (Fu et al., 2017; Id et al., 2020). Comparação genômica de três linhagens referencia (LT2, SL1344, ATCC 14028, D23580) de *S. Typhimurium*, apresenta a linhagem SL1344 carregando 148 genes contidos em três profagos e 112 genes em dois plasmídeos e 10 pseudogenes (Branchu, 2018). Comparação com clones em pandêmicos, cepa DT104 apresenta uma ilha genômica SGI-1 (ICE) e em DT193/ DT120 o transposon (SGI-4) com resistência a múltiplas drogas (Branchu et al., 2018). A determinação do perfil antimicrobiano foi por muito tempo baseado no cultivo de bactérias, técnica de PCR multiplex e recentemente a previsão e complementação do teste de susceptibilidade antimicrobiana é derivada do sequenciamento genômico (Hendriksen et al., 2019). Determinação da susceptibilidade antimicrobiana usando

o sequenciamento e o teste fenotípico em linhagens NTS e *S. Typhimurium* demonstrou uma concordância de 89.9% to 100% e identificou múltiplos genes AMR com resistência moderada a aminoglicosídeo, tetraciclina, betalactâmicos e sulfonamida, e sua associação a plasmídeos resistentes (McDermott et al., 2016; McMillan et al., 2019; Mensah et al., 2019).

2.3.1 Polimorfismo de nucleotídeo único

As variações mais comuns entre genomas estão os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e indels (inserções e deleções). Ferramentas para identificar variantes são desenvolvidas frequentemente para eucariotos. As mais comuns para os alinhamentos são Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012), BWA-mem, HISAT2 (Kim et al., 2019) e os identificadores de variantes Freebayes (Garrison & Marth, 2012), GATK HaplotypeCaller (Depristo et al., 2011) e mpileup (H. Li et al., 2009). O pipeline Snippy (<https://github.com/tseemann/snippy>) é um pipeline desenvolvido para análises de bactérias que inclui o BWA-mem para o alinhamento de *reads*, Freebayes para identificação de variantes e snpeff para a anotação e informações das variantes. Todas as ferramentas procuram identificar variantes com alta sensibilidade e especificidade. A identificação precisa de SNPs é importante na monitoração de surtos e predição de fenótipos, como a resistência antimicrobiana (Bush et al., 2020).

2.3.2. Similaridade nucleotídica e tipagem

A identidade média de nucleotídeo (ANI) alinha fragmentos de DNA de duas amostras e considera uma identidade maior que 95% como evidência de amostras da mesma espécie. A identidade abaixo deste valor tornaria a recombinação menos frequente, isolando geneticamente as populações de bactérias (Jain et al., 2018). Métodos de tipagem foram desenvolvidos para estudar populações bacterianas. A Tipagem de Sequência Multilocus (MLST) compara a sequência de genes conservados em linhagens da mesma espécie. Um número é designado para cada alelo e cada perfil de alelo é uma sequência tipo (ST). Em um esquema de sete locos, um grupo de STs que compartilham pelo menos cinco alelos forma um complexo clonal (CC) (Christensen & Olsen, 2018). A Tipagem de Sequência Multilocus do genoma Inteiro (wgMLST) ou cgMLST inclui todos os genes conservados estimados ou selecionados, permitindo múltiplos níveis de resolução. O agrupamento hierárquico de cgMLST (HierCC) define clusters com base em core genoma MLST. Os clusters são o

número de cluster estáveis a diferentes distâncias do alelo cgMLST, por exemplo, para *Salmonella*, a persistência endêmica de longo prazo parece ser diferenciada nos HC100 ou HC200 (Zhou et al., 2020).

2.3.3 Estrutura populacional

A análise de estrutura populacional descreve a variação em uma população de espécie ou gênero. Essa variação é considerada estrutural e divide a população em várias subpopulações geneticamente distintas. Uma subpopulação é um grupo de indivíduos que interagem com mais frequência, isto inclui maiores eventos de recombinação uns com os outros, do que com indivíduos mais distantes. A dinâmica populacional é, em princípio, uma interação complexa de processos evolutivos, como mutação e recombinação, que são reguladas por fatores ambientais, como deriva genética, migração e seleção. O grau de tal subdivisão também pode ser afetado por fatores geográficos, temporais e ecológicos.

Uma eficiente predição da variação requer um grande número de linhagens representativas de toda a população (Maiden et al., 1998; Spratt et al., 2004). O modelo mais usado para a predição é a inferência bayesiana. Entre as ferramentas mais utilizadas está STRUCTURE, um método de agrupamento baseado no modelo Bayesiano que usa o algoritmo Monte Carlo de cadeia de Markov padrão (MCMC) (Falush et al., 2003). Este método é seguido pela ferramenta BAPS, que usa o modelo bayesiano e adiciona o desconhecimento a priori do número de clusters (K). Posteriormente, a ferramenta HierBAPS adicionou uma abordagem de agrupamento hierárquico, que aumenta o poder estatístico baseado na reclusterização (Tonkin-Hill et al., 2018).

2.3.4 Filogenética e filogenômica

A análise filogenética busca inferir a história evolutiva e a relação entre os organismos a partir de sequências de ácidos nucleicos ou aminoácidos (Eisen & Fraser, 2003). Os métodos filogenômicos são baseados na construção de filogenias usando por exemplo o conteúdo de genes (Huson & Steel, 2004) e as sequências concatenadas (Rokas et al., 2003). As reconstruções filogenômicas são a base de estudos importantes como mapeamento da transmissão de patógenos, distribuição geográfica, identificação de linhagens emergentes e estudos de associação genótipo-fenótipo. No entanto, a árvore baseada em SNPs é a técnica

mais usada, conseguindo distinguir entre genomas intimamente relacionados (E. Klemm & Dougan, 2016).

Os estudos de inferência evolutiva partiram inicialmente de alguns isolados representativos, mas na atualidade, existe um aumento de genomas sequenciados disponíveis pertencentes a patógenos humanos permitindo uma melhor definição da realidade estrutural e evolutiva populacional (Bentley & Parkhill, 2015). No entanto, é importante ressaltar que a construção filogenética apresenta desafios como consequência de trocas laterais que introduzem múltiplas mutações por recombinação homóloga (Croucher et al., 2015).

2.3.5. Pangenômica.

Aumentar o número de sequenciamentos de linhagens da mesma espécie pode elucidar diferenças no conteúdo de genes, que revelam a enorme variabilidade intraespecífica em procariotos (McInerney et al., 2017). O conceito do pangenoma descreve todas as famílias de genes em todos os isolados que estão presentes na população, espécie ou gênero. O pangenoma é subdividido em três grupos: (i) genoma central, que contém genes presentes em todos os genomas e participam dos processos celulares essenciais; (ii) genoma acessório, que contém genes presentes em pelo menos dois genomas e ausente nos demais; e (iii) genes únicos, que são exclusivos de uma única linhagem. Um pangenoma é considerado aberto quando se prevê o aumento do repertório gênico com a inclusão de mais genomas na análise (Tettelin et al., 2008).

A fonte dominante de variabilidade do conteúdo de genes é a aquisição e perda de genes por mecanismos de transferência horizontal e em menor frequência as duplicações gênicas (Treangen & Rocha, 2011). Genes acessórios associados a um fenótipo específico geralmente têm funções que conferem uma vantagem seletiva (Frost et al., 2005; McInerney et al., 2017).

2.3.6 Elementos Genéticos Móveis.

A plasticidade genômica é a chave da enorme diversidade e adaptação bacteriana. Os recursos da variação se baseiam nas mutações pontuais (SNPs, indels) e a transferência de elementos genéticos móveis (MGEs). Os MGEs são regiões de DNA codificantes que permitem a mobilização dentro e fora do genoma bacteriano, entre eles plasmídeos, profagos,

ilhas genômicas (GEIs), sequências de inserção (ISs), elementos conjugativos integrados (ICEs) e transposons (Tns).

Os MGEs são transferidos pelos seguintes mecanismos: transformação, transdução e conjugação (Frost et al., 2005). As ilhas genômicas (GEIs) são grandes regiões de ampla relevância evolutiva a nível do cromossomo e que perdem a mobilidade ao longo do tempo (Frost et al., 2005). A presença de plasmídeos confere vantagens adaptativas e aumenta a sobrevivência (Lan et al., 2009). Os plasmídeos são classificados por tipo de replicação, relaxase e mobilidade, sendo esta última, classificada em plasmídeo conjugativo, mobilizável e não mobilizável pelo conteúdo das sequências oriT, relaxase, proteína de acoplamento tipo IV (T4CP) e sistema de secreção tipo IV (T4SS) (Robertson & Nash, 2018). Os ICEs são elementos conjugativos integrativos no genoma. Sequências de inserção e transposons apresentam a capacidade da transposição pela recombinação homóloga. Normalmente, uma IS consiste em um gene que codifica uma enzima transposase, sendo flanqueado por repetições invertidas. Os transposons são constituídos por dois ISs flanqueando e geralmente contêm genes.

2.3.7 Banco de dados e ferramentas para a detecção de resistência antimicrobiana

A classificação de uma linhagem como genotipicamente sensível ou resistente é baseada na identificação de genes e/ou mutações conhecidas, associadas com resistência. A detecção de determinantes de resistência varia segundo a escolha das ferramentas de bioinformática e a base de dados utilizada. As bases de dados são constituídas por genes associados à resistência antibiótica e que foram vinculados a ensaios moleculares ou referenciados pela literatura (Su et al., 2019). Assim, espera-se que elas se encontrem continuamente em atualização.

As bases de dados com informações de múltiplas espécies incluem CARD (Jia et al., 2017), que é uma base de dados curada com dados de entrada publicados em artigo científicos, seguido de ResFinder (Zankari et al., 2012), ARG-ANNOT (Gupta et al., 2014), MEGARes (Lakin et al., 2017), Resfams (Gibson et al., 2015) e o Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gen Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/313047>) (Hendriksen et al., 2019).

Para análises de resistência a nível genômico, as ferramentas acima usam como entrada sequências de leituras e/ou contigs. Os métodos baseados em leitura podem usar diferentes ferramentas para alinhar as leituras aos bancos de dados AMR, incluindo Bowtie2,

BWA e KMA (Boolchandani et al., 2019). Entre as ferramentas mais conhecidas está a KmerResistance, que avalia a ocorrência de k-mers baseado no mapeamento direto contra a base de dados AMR (Clausen et al., 2016). Esta é uma análise rápida, em contraste com o método de mapeamento usando BWA, que usa genomas de referência.

Outra ferramenta importante é o SRST2 (Inouye et al., 2014), que realiza o mapeamento das leituras contra a base de dados usando Bowtie. ARIBA é outra ferramenta popular que recebe como entradas leituras e contigs, realiza a predição de genes e alelos AMR e testes de associação para uma melhor interpretação dos resultados (Hunt et al., 2017). As vantagens do uso de leituras como entrada seriam o tempo reduzido no processamento comparado à realização de uma montagem prévia, identificação de genes AMR de baixa abundância, e predição de variantes com uma adequada cobertura de profundidade. As desvantagens se devem à dependência de um genoma de referência para mapeamento e a detecção enviesada de variantes.

As ferramentas conhecidas que usam como entrada contigs são PointFinder (Zankari et al., 2017), CARD RGI (Jia et al., 2017), ARG-ANNOT (Gupta et al., 2014), ResFinder (Zankari et al., 2017) e ABRicate [<https://github.com/tseemanNAbriicate>]). A predição se baseia num blast entre a sequência query e o subject que representa a base de dados de proteínas ou genes AMR, avaliando longitude e porcentagem de similaridade do alinhamento. As vantagens de predizer AMR a partir de *contigs* é conseguir contextualizar determinantes AMR em regiões mobilizáveis e as desvantagens estão relacionadas à demanda computacional na montagem, à perda de genes pela presença de contigs sem concatenar e à determinação de uma cópia somente de sequência consenso em regiões polimórficas de múltiplas cópias (Hendriksen et al., 2019).

2.3.8 Comparação entre perfis fenotípico e genotípico de AMR

A principal vantagem da vigilância do resistoma é conseguir predizer com alta precisão a resistência antimicrobiana a partir dos dados genômicos. A comparação entre o genótipo e o fenótipo mostra uma boa concordância entre o que se sabe sobre a base genética da resistência e a avaliação fenotípica. A avaliação é baseada na concordância entre a presença de genes conhecidos, mutações AMR e os valores (seguindo os valores do MIC ou diâmetro do halo) no ponto de corte clínico para resistência (Hendriksen et al., 2019). Os números de cepas são dispostos numa tabela de contingência segundo os resultados para genótipos e fenótipos suscetíveis ou resistentes.

Parâmetros de avaliação do sistema WGS-AST são: especificidade, sensibilidade, valores preditivos positivos (PPV) e valores preditivos negativos (NPV), precisão [Coeficiente de Correspondência Simples (SMC)] e desempenho [coeficiente de correlação de Matthew (MCC)] (Clausen et al., 2016). A sensibilidade (Taxa de verdadeiros positivos) define a capacidade de identificar corretamente cepas com determinantes de AMR dos que são fenotipicamente resistentes. Especificidade (taxa de verdadeiros negativos) é definida pela capacidade de identificar corretamente a ausência de determinante de AMR em fenótipos suscetíveis. Uma alta sensibilidade e especificidade são considerados valores acima de 87% e 98%, respectivamente (Hendriksen et al., 2019).

A correlação do perfil fenotípico e genotípico é avaliada pelo nível de predições assertivas dos genótipos sensíveis e resistentes, em concordância com os resultados fenotípicos sob o total de testes avaliados (# antibióticos x # de isolados). A discrepância é avaliada pelo cálculo de erros principais (MEs) ou erro tipo I, isolados que foram genotipicamente preditos como resistentes, mas mostraram susceptibilidade fenotípica sob o total de testes que se avaliaram (# antibióticos x # de isolados). Erros muito graves (VMEs) ou erro Tipo II, são devido ao caso de isolados genotipicamente suscetíveis, mas fenotipicamente resistentes sob o total de testes que se avaliaram (# antibióticos x # de isolados). Taxas abaixo dos pontos de corte de 3 e 1,5% de ME e VMEs, respectivamente, são permitidos para autorizar novos dispositivos de teste de susceptibilidade (FDA, 2021).

Altos valores de MEs podem sugerir uma adaptação nos pontos de corte fenotípicos, já que poderiam falsamente classificar como linhagens suscetíveis (Garcia-Migura et al., 2012). Divergências relacionadas com a caracterização genotípica se devem à perda de genes AMR em MGEs durante o armazenamento ou subcultivo. Outra variável seria o silenciamento de genes de resistência. Altos valores de VMEs, se devem à falta de atualização e curadoria das bases de dados (Neuert et al., 2018). Os resultados falsos negativos são considerados os mais preocupantes, pois podem levar ao tratamento inadequado de uma infecção resistente, aumentando a morbimortalidade e os resultados falsos positivos levarem ao uso inadequado de antibióticos, prejudicando potencialmente o paciente e aumentando o risco de resistência aos antibióticos de última linha (Hendriksen et al., 2019).

2.3.9 Estudo de associação genômica ampla (GWAS) da AMR

A estratégia de GWAS permite identificar variantes causais no genoma que estão associadas com o fenótipo (resistência antibiótica, virulência, preferência de hospedeiro) do

microrganismo (San et al., 2020), incluindo a descoberta de novas variantes associado a qualquer fenótipo. Os mecanismos primários de variações genéticas são SNPs e INDELs (inclui inserções e deleções) (Dutilh et al., 2013). O GWAS pode trabalhar sob SNPs, K-mers e presença ou ausência de genes (San et al., 2020).

As ferramentas primárias no estudo de humanos usadas popularmente para a chamada de variantes são GATK (Depristo et al., 2011) e SAMtools (H. Li et al., 2009); e para a análise de associação, são PLINK (Purcell et al., 2007) e FaST-LMM (Lippert et al., 2011), porém não estão diretamente implementadas para análise no genoma microbiano. Definir o tipo de análise estatística depende também do tipo do fenótipo como variável binária, categórica ou contínua. No caso do fenótipo binário, a associação é definida pelo p-valor usando o teste chi-quadrado, com a adição de uma covariável (estratificação populacional), e usando o teste Mantel-Haenszel-Cochran ou regressão logística (Chen & Shapiro, 2015) implementados em R. As ferramentas que apresentam seus algoritmos próprios baseados na dinâmica da genética bacteriana adicionam variáveis como estruturação populacional, taxa de recombinação, efeito de multiplex SNPs, epistasia e ajuste da diversidade. Entre as ferramentas que consideram a maioria de variáveis estão a SEER, PySEER (Lees et al., 2018) e DBGWAS (Jaillard et al., 2018).

Os principais resultados do GWAS baseado em SNPs especifica a posição do alelo, p-valor, os SNPs (referência e alternativos), frequências de alelos menores (MAF), tamanho do efeito (varia para características quantitativas ou binárias) e erro padrão (SE). Os resultados são visualizados no gráfico de Manhattan cujo eixo X é a posição SNP e no eixo Y valor p ou $-\log(\text{valor } p)$ dos SNPs. Uma linha horizontal no gráfico delinea o limite de significância de todo o genoma. Valores acima da linha são considerados estatisticamente significativos (San et al., 2020). O método apresenta alguns desafios, principalmente, o desequilíbrio de ligação (LD) interrompido por recombinação homóloga e forte estrutura populacional resultante de expansões clonais.

Na estruturação populacional, as subpopulações apresentam diferentes frequências de alelos e fenótipos, que resultam em associações espúrias entre genótipos e fenótipos devido à ancestralidade compartilhada, em vez de associações causais (H. C. Wang et al., 2019). Outros fatores que influenciam na associação são o tamanho da amostra e a distribuição do tamanho efetivo (San et al., 2020).

2.4 VIGILÂNCIA GENÔMICA DA SALMONELOSE NO PERU

No Peru, as infecções por *Salmonella* ocorrem principalmente através da transmissão por alimentos e água de consumo, constituindo um problema de saúde pública (Quino, Hurtado, et al., 2020; Zamudio et al., 2011). Porém, poucos são os registros epidemiológicos e informações sobre o sequenciamento dos membros do gênero. O Ministério de Saúde detectou 134, 57 e 88 surtos relacionados a doenças transmitidas por alimentos entre 2003-2007, 2010-2012 e 2014-2019, respectivamente. Foram reportados 2,339,734 casos de diarreia entre 2018-2019 (MINSa, 2019; Quino, Hurtado, et al., 2020; Zamudio et al., 2011).

Quino et al. (2020b) reportam que entre 2012 e 2015 foram isoladas 540 linhagens de *S. enterica*, que incluíram 520 amostras clínicas e outras provenientes de animais e ambientais. Em humanos, os sorovares isolados mais frequentes foram Infantis (57%), Enteritidis (27%) e Typhimurium (6%). Em amostras não humanas, os sorotipos isolados mais frequentes foram Infantis (45%), Typhimurium (40%) e Enteritidis (10%). Do total das linhagens, 65% apresentaram resistência a mais de dois antimicrobianos e 43,3% foram produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) (Quino, Hurtado, et al., 2020).

Em estudos genômicos recentes, análises de estruturação populacional em 180 amostras de *S. Enteritidis* de isolados clínicos e alimentos entre 2000 e 2018 reportaram a presença de dois grandes clados subdivididos em quatro grupos populacionais e diferenciados pela presença de um fator de virulência, *sdhA* (Quino, Caro-Castro, et al., 2020). Quino et al. (2019) reportou que 193 (65% do total) isolados, foram sorovar Infantis e 134 delas foram MDR, produtoras de betalactamase de espectro estendido, além disso, 46 linhagens foram resistentes a fluoroquinolonas (Quino et al., 2019). Concluindo que a ordem de sorovares de maior para menor frequência são Infantis, Enteritidis e Typhimurium e houve presença de resistência à cefalosporinas de terceira geração e fluoroquinolonas.

3 JUSTIFICATIVA

Salmonella Typhimurium é um dos principais patógenos causadores de doenças transmitidas por alimentos, constituindo um problema de saúde pública global. Este sorovar é altamente relevante do gênero *Salmonella*, devido à sua alta diversidade genética, ampla adaptação gradual aos hospedeiros e por provocar alta incidência de doenças entéricas, sendo o terceiro sorovar reportado nos casos clínicos e o primeiro em casos de Salmonelose em animais de criação.

Em relação aos animais de criação, o porquinho-da-Índia é um animal doméstico de alto valor proteico, que possui um sistema de criação familiar até uma produção intensiva na

região andina, sendo o Peru o maior produtor internacional. Apesar de sua alta relevância econômica e nutricional para essa região, casos de Salmonelose vem causando uma alta morbidade e mortalidade destes animais. Isso ocorre devido às limitações no manejo e condições sanitárias precárias, assim como o desenfreado uso de antibióticos para o controle da infecção. Estes fatores que afetam o sistema de alimentos, somado à falta de acesso à água e saneamento, estão implicados numa alta incidência de surtos e doenças alimentares em humanos, como gastroenterite e casos de diarreia, que atingem a saúde pública do país.

A Organização Mundial da Saúde inseriu o gênero *Salmonella* na lista de patógenos de ameaça pública, devido ao aumento de cepas multidroga-resistentes a diferentes classes de antibióticos, incluindo os atuais arsenais terapêuticos (cefalosporinas de espectro estendido e ciprofloxacino). Nesse contexto, no Peru cada vez mais se registra um alto perfil de resistência antimicrobiana para isolados dos mais prevalentes sorovares procedentes de amostras clínicas e do porquinho-da-Índia de criação.

Atualmente no Peru, a vigilância epidemiológica e resistência antimicrobiana de *Salmonella* são baseados em estratégias moleculares e microbiológicas convencionais, com um recente limitado incremento de abordagens utilizando sequenciamento genômico destes isolados. Assim, existe uma reduzida e não direcionada vigilância genômica da diversidade e resistência antimicrobiana para *S. Typhimurium* procedentes de doenças entéricas em humanos e de casos de Salmonelose no porquinho-da-Índia.

Este trabalho faz parte do sistema de vigilância clínica e veterinária do sorovar *S. Typhimurium* na região do Peru, e assim, os dados obtidos no presente trabalho irão contribuir no registro de populações e diversidade genômica das linhagens que circulam no Peru. Nosso estudo permitirá também avaliar se o sistema de predição da resistência pode ser baseado a partir do genoma, assim como a identificação de específicos elementos móveis, filogrupos e novos mecanismos que estejam implicados na disseminação da resistência antimicrobiana. Além disso, permitirá uma melhor vigilância de linhagens multidroga-resistentes dos centros hospitalares e de criação do porquinho-da-Índia, de forma que estratégias de controle da disseminação da resistência e prescrição de antimicrobianos, sejam implementados, assim como a elaboração de projetos voltados à melhora nas condições sanitárias do País.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAL

Investigar a diversidade e determinantes resistência antimicrobiana usando as sequências genômicas de *Salmonella* Typhimurium isoladas de humanos e porquinho-da-Índia no Peru.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Elucidar a diversidade genética, filogenia e populacional das linhagens *S.* Typhimurium de amostras clínicas e porquinhos-da-índia no Peru;
2. Caracterizar e mapear os determinantes genéticos da resistência antimicrobiana (elementos móveis, genes e mutações) nos isolados *Salmonella* Typhimurium de amostras clínicas e porquinho-da-Índia no Peru;
3. Avaliar e comparar a predição genômica e fenotípica do perfil de resistência antimicrobiana de *Salmonella* Typhimurium isolados de amostras clínicas de no Peru;
4. Investigar a relação filogenética entre linhagens e seus elementos genéticos móveis provenientes de porquinhos-da-Índia de criação e de alimentos.

5 RESULTADOS

5.1 CAPÍTULO I - WGS-BASED LINAGE AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE PATTERN OF *SALMONELLA* TYPHIMURIUM ISOLATED DURING 2000–2017 IN PERU.










Este artigo foi publicado no periódico ANTIBIOTICS (Fator de impacto: 4.94) em agosto de 2022.

A *Salmonella enterica* causa doenças de transmissão alimentar e é considerada um patógeno de alta prioridade e ameaça global pela crescente resistência à fluoroquinolona e cefalosporina de terceira geração. Por esta razão foi realizado um projeto de vigilância epidemiológica entre 1999 e 2017 que consiste no sequenciamento e teste da susceptibilidade antimicrobiana em 1.000 linhagens pertencentes ao Género *Salmonella*, das quais 90 pertencem ao sorovar Typhimurium. No Peru, *S. Typhimurium* constitui um dos mais prevalentes patógenos, sendo o terceiro mais frequente em casos de gastroenterites em humanos e o segundo em casos de salmonelose em animais. Este trabalho pretende, por meio de um estudo genômico e fenotípico, identificar os filogrupos e padrões de resistência circulantes do sorovar Typhimurium no Peru entre os anos 2000 e 2017. As análises consistiram nos seguintes passos: (1) Tipificação do sorovar, MLST e análise de ANI, (2) Contextualização da diversidade, filogenia, pangenoma e estruturação populacional circulando no Peru e comparadas com linhagens isoladas a nível global, (3) Avaliação do resistoma pela predição das mutações, genes e plasmídeos conhecidos associados à resistência, predição de SNVs associados a AMR usando Genome-Wide Association Study (GWAS) e correlação genótipo-fenótipo. A partir dos dados obtidos, identificamos pelo menos 10 clusters de sequências (SCs) circulando no Peru, dos quais as SC5 e SC19 são clados que emergiram recentemente. Nas linhagens peruanas encontramos uma abrangente diversidade, com 2.665 SNPs e um genoma acessório contendo 4.666 genes que compreendem 52% do pangenoma. Identificamos um plasmídeo de virulência (IncFIB) presente em todas as linhagens, com exceção de 6 linhagens pertencentes principalmente a SC18. Em 29 linhagens pertencentes principalmente a SC9, SC4 e SC18 carregando importantes plasmídeos resistentes transmissíveis, IncI1-I(Alpha), Col(pHAD28), IncFIB, IncHI2, and IncI2. O perfil de susceptibilidade antimicrobiana mostrou que 70 (64,81%) linhagens não eram resistentes a todos os antibióticos. Fenotipicamente, 13 linhagens (12,03%) eram multirresistentes (MDR). As maiores frequências de resistência foram para tetraciclina (17, 18.9%), ácido nalidíxico (18, 20%), ampicilina (14, 15.6%) e nitrofurantoína

(13, 14.4%). Esses fenótipos estão associados aos genes *tetA*, *tetG*, *tetC* (tetraciclina); *qnrB19*, *qnrB42*, *qnrB5*, e mutação do *gyrA* (83) (resistência ao ácido nalidíxico); *blaTEM-1* (ampicilina) e exceto para nitrofurantoína. Concluiu-se que existem filogrupos que possuem um mosaico de plasmídeos e genes AMR associados a resistência a antibióticos de importância pública (cefalosporinas de espectro estendido, fluoroquinolonas, colistina e fosfomicina). Esses resultados são um alerta da potencial ameaça na segurança alimentar e saúde pública, sugerindo que uma ativa vigilância epidemiológica da resistência antimicrobiana para *S. Typhimurium* e outros sorovares de *S. enterica* no Peru deve ser realizada.

Article

WGS-Based Lineage and Antimicrobial Resistance Pattern of *Salmonella* Typhimurium Isolated during 2000–2017 in Peru

Raquel Hurtado ¹, Debmalya Barh ^{1,2,*}, Bart C. Weimer ^{3,*}, Marcus Vinicius Canário Viana ¹, Rodrigo Profeta ¹, Thiago Jesus Sousa ¹, Flávia Figueira Aburjaile ^{1,4}, Willi Quino ⁵, Renan Pedra Souza ⁶, Orson Mestanza ⁵, Ronnie G. Gavilán ^{5,7} and Vasco Azevedo ^{1,*}

- ¹ Laboratório de Genética Celular e Molecular, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil
 - ² Institute of Integrative Omics and Applied Biotechnology (IIOAB), Nonakuri, Purba Medinipur 721172, West Bengal, India
 - ³ Department of Population Health and Reproduction, School of Veterinary Medicine, 100K Pathogen Genome Project, University of California, Davis, CA 95616, USA
 - ⁴ Veterinary Medicine Department, Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil
 - ⁵ Instituto Nacional de Salud, Lima 15072, Peru
 - ⁶ Laboratório de Biologia Integrativa, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil
 - ⁷ Escuela Profesional de Medicina Humana, Universidad Privada San Juan Bautista, Lima 15072, Peru
- * Correspondence: dr.barh@gmail.com (D.B.); bcweimer@ucdavis.edu (B.C.W.); vascoariston@gmail.com (V.A.)

Abstract: *Salmonella* Typhimurium is associated with foodborne diseases worldwide, including in Peru, and its emerging antibiotic resistance (AMR) is now a global public health problem. Therefore, country-specific monitoring of the AMR emergence is vital to control this pathogen, and in these aspects, whole genome sequence (WGS)—based approaches are better than gene-based analyses. Here, we performed the antimicrobial susceptibility test for ten widely used antibiotics and WGS-based various analyses of 90 *S. Typhimurium* isolates (human, animal, and environment) from 14 cities of Peru isolated from 2000 to 2017 to understand the lineage and antimicrobial resistance pattern of this pathogen in Peru. Our results suggest that the Peruvian isolates are of Typhimurium serovar and predominantly belong to sequence type ST19. Genomic diversity analyses indicate an open pan-genome, and at least ten lineages are circulating in Peru. A total of 48.8% and 31.0% of isolates are phenotypically and genotypically resistant to at least one antibiotic, while 12.0% are multi-drug resistant (MDR). Genotype–phenotype correlations for ten tested drugs show >80% accuracy, and >90% specificity. Sensitivity above 90% was only achieved for ciprofloxacin and ceftazidime. Two lineages exhibit the majority of the MDR isolates. A total of 63 different AMR genes are detected, of which 30 are found in 17 different plasmids. Transmissible plasmids such as IncI-gamma/k, IncI1-I(Alpha), Col(pHAD28), IncFIB, IncHI2, and IncI2 that carry AMR genes associated with third-generation antibiotics are also identified. Finally, three new non-synonymous single nucleotide variations (SNVs) for nalidixic acid and eight new SNVs for nitrofurantoin resistance are predicted using genome-wide association studies, comparative genomics, and functional annotation. Our analysis provides for the first time the WGS-based details of the circulating *S. Typhimurium* lineages and their antimicrobial resistance pattern in Peru.

Keywords: antimicrobial resistance; multi-drug resistance; *Salmonella* Typhimurium; whole-genome sequencing; resistance plasmids; antimicrobial susceptibility test; GWAS



Citation: Hurtado, R.; Barh, D.; Weimer, B.C.; Viana, M.V.C.; Profeta, R.; Sousa, T.J.; Aburjaile, F.F.; Quino, W.; Souza, R.P.; Mestanza, O.; et al. WGS-Based Lineage and Antimicrobial Resistance Pattern of *Salmonella* Typhimurium Isolated during 2000–2017 in Peru. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1170. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091170>

Received: 29 July 2022

Accepted: 23 August 2022

Published: 30 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Salmonella Typhimurium, and other non-typhoidal *Salmonella* (NTS), are responsible for foodborne illnesses worldwide [1]. NTS can cause gastrointestinal disease, progressing

to systemic infections in some patients. The World Health Organization (WHO) recently declared *Salmonella* a high-priority pathogen due to increased resistance to first-line antibiotics, fluoroquinolones, and third-generation cephalosporins [2]. In Peru, 234 foodborne outbreaks were reported between 2014 and 2018. In 2019, 1,204,136 diarrheal cases were reported mainly due to contaminated drinking water and food [3,4]. *S. enterica* serovars, mainly Infantis, Enteritidis, and Typhimurium, were associated with gastroenteritis in Lima hospitals during 2008–2013 and 2015–2017 [5,6]. Additionally, multi-drug resistant (MDR) *Salmonella* Infantis isolates resistant to first-line antibiotics, third-generation cephalosporins, and ciprofloxacin antibiotics are highly prevalent in Peru [7,8]. Unfortunately, limited studies are using whole-genome sequencing (WGS) strategies to understand diversity, alignment with antimicrobial resistance (AMR) phenotype and the AMR prevalence of circulating *Salmonella*.

S. Typhimurium has a broad host range and emerging dominant MDR phenotypes. For example, the MDR DT104 group disseminated rapidly globally [9], and ST313, an MDR group, is responsible for invasive diseases in Africa [10]. Apart from chromosomal mobile AMR genes mobile genetic elements, such as plasmids and pathogenic islands, are essential in expanding AMR distribution among the population and are often associated with hospital-acquired infections and foodborne outbreaks [8–12]. MDR *Salmonella* isolated in various countries largely contain genes for β -lactam, tetracycline, aminoglycoside, and quinolone resistance on plasmids [13,14].

The use of WGS in molecular epidemiology and AMR surveillance has several advantages as compared to conventional PCR, other molecular methods, or phenotypic approaches [15–17]. Since *S. Typhimurium* exhibits a broad and diverse host range, pathogenicity, and risk to human health [18–20]; WGS-based comparative and phylogenetic analysis as part of AMR surveillance is a promising approach to rapidly predict resistances that is much faster than phenotypic methods. Reports indicate that WGS-based approaches to predicting antimicrobial susceptibility with a good correlation between genotype and phenotype, detecting and tracing outbreaks, and determining the complement of AMR determinants are essential resources in the appropriate selection of antibiotic treatment in *S. Typhimurium* infections [8,21–24]. Furthermore, this approach allows the discovery of new AMR genes, or alleles of known AMR genes, as reported in various pathogenic bacteria [12,25,26]. Comparative genomics and genome-wide association studies (GWAS) have identified these potential causal variants associated with virulence and with AMR in multiple organisms [26,27].

In this study, we used whole genome sequences of *S. Typhimurium* isolates from a Peruvian surveillance study to determine its Peru-specific lineage and antimicrobial resistance pattern. More specifically, we classified the *S. Typhimurium* serovars using serotyping, multi-locus sequence typing, and average nucleotide identity (ANI) analysis approaches. Further, the nucleotide diversity, phylogenetic, pan-genome, and population structure analyses were carried out to determine the genome diversity of the circulating Peruvian *S. Typhimurium* isolates. Finally, identification and characterisation of AMR genes, GWAS-based prediction of new non-synonymous single nucleotide variation (SNVs) for AMR, prediction of AMR effect of newly identified SNVs, and genotype–phenotype correlations were performed for antimicrobial resistome profiling of these isolates. The overview of the methods applied, and the objectives of this study are represented in Figure 1.

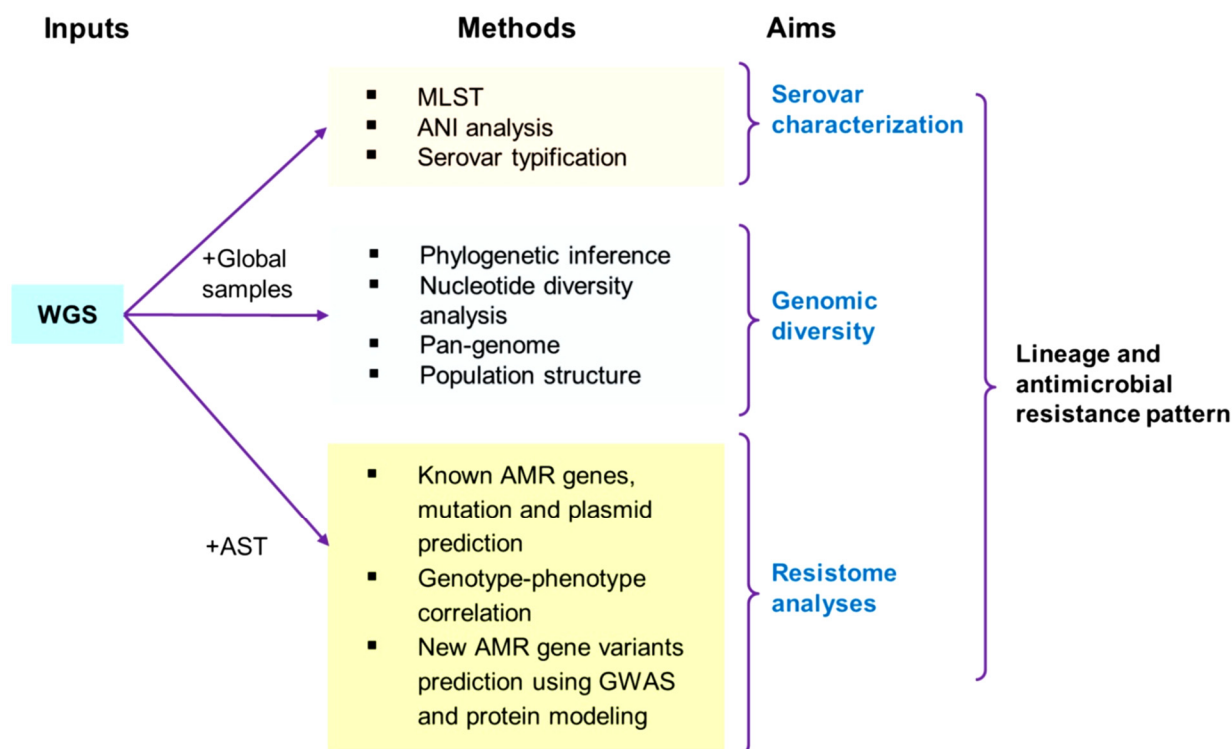


Figure 1. The overview of methods and objectives of this study.

2. Materials and Methods

2.1. Samples and Collection Sites

We examined 90 pathogenic *S. Typhimurium* isolated from humans ($n = 78$), animals ($n = 3$) and the environment ($n = 9$). The isolates were collected between 2000 and 2017 from 14 cities in Peru, as shown in the global map (<https://glenjasper.github.io/leaflet-salmonella>).

2.2. Antibiotic Susceptibility Test

The disk diffusion method [28] was used to determine AMR following Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI) guidelines for ten commonly used antibiotics: ampicillin (AM), chloramphenicol (C), ciprofloxacin (CIP), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), cefotaxime (CTX), nalidixic acid (NA), amoxicillin-clavulanate (AMC), nitrofurantoin (N), tetracycline (TE), and ceftazidime (CAZ). MDR was defined as resistance to at least three antibiotics. The intermediate or reduced susceptibility phenotype was considered a susceptible isolate (Supplementary Table S1).

2.3. Whole Genome Sequencing

We used Peruvian *Salmonella Typhimurium* genome (90 isolates) sequence raw reads generated under the 10K *Salmonella* Project (BioProject: PRJEB35182). After assembly and annotation, we submitted these genomes to the BioProject (PRJNA635403) as “Peruvian *Salmonella* spp. Genome sequencing and assembly”. The genome sequencing was performed within the 10K *Salmonella* Project as described by Perez-Sepulveda et al., 2021 [29]. Additionally, a global set of 50 genomes were obtained from the Genbank database and included in the further analysis to estimate the diversity and ancestry of Peruvian isolates globally (Supplementary Table S2).

2.4. Genome Assembly, Annotation, and Plasmid Detection

The raw fastq sequences from the Illumina 150 bp paired-end were checked for quality using FastQC v0.11.8 [30]. De novo genome assembly was performed using Unicycler

v0.4.5 [31], and the quality of the assembly was evaluated using Quast v3.2 [32] and BUSCO v4.0.6 [33]. Contigs < 200 bp were removed, and the assembled genomes were submitted under BioProject: PRJNA635403. For further analysis, the annotation was performed using PROKKA v1.11 [34], and only the genome sequences with >20× depth coverage were considered. We considered 20× to be the minimum coverage to include the maximum number of our isolates ($n = 90$ out of a total $n = 109$) for core genome analysis, variant determination, and monitoring of infectious outbreaks in other previous studies [35–37]. Plasmids were predicted and reconstructed from the assembled genomes using MOB-suite [38] and classified as conjugative, mobilisable, and non-mobilisable plasmids. PlasmidFinder [39] and ABRicate (<https://github.com/tseemann/abricate>; accessed on 4 April 2022) were also used to crosscheck the MOB-suite results.

2.5. *In Silico* Serotyping, MLST, and ANI Analysis

The serovar and sequence types were predicted using SeqSero [40] and MLST (<https://github.com/tseemann/mlst>; accessed on 5 April 2022) [41], respectively. Pairwise average nucleotide identity (ANI) values were calculated using FastANI v1.1 [42] to determine the degree of genomic relatedness. Results were visualised using the ggplot2 V.3.3.5 (<https://ggplot2.tidyverse.org/reference/index.html>; accessed on 5 April 2022). The respective tools' assembled genomes and default parameters were used for these analyses.

2.6. Pan-Genome and Phylogenetic Analysis

Core and accessory genes were identified using Roary v3.12 [43] with default settings. The R package micropan v.2.1 [44] was used to model the openness of the pan-genome using Heaps' law as described by Tettelin et al., [45] with the number of permutations set to 1000. Values $\alpha \leq 1$ represent an open pan-genome, where adding new genomes will increase the pan-genome substantially. For this analysis, we used our Peruvian samples and 50 *S. Typhimurium* isolates from 29 countries distributed on six continents (Asia, Europe, Africa, Australia, and North and South America). We used *S. Typhimurium* (LT2, GenBank: NC_003197) as the reference. Core genome-SNPs were predicted using Snp-sites [46] from the Roary v3.12 [43] core genome output. Phylogenetic analysis was based on core genome genes of the Peruvian and 140 global samples. The RaxML v8.2.12 [47], maximum likelihood method, GTR + Gamma model, and 1000 bootstrap replicates were applied to create the Phylogenetic trees that were visualised using the ggtree package in R (R Development Core Team, 2016).

2.7. Population Structure and Diversity Analyses

The population structure for two sample sets was determined separately using core gene SNPs: (i) Peruvian and (ii) Peruvian + 50 global samples. The Bayesian analysis of population structure (BAPS) [48] model was defined using RhierBAPS v1.0.1 [49]. The nucleotide variation analysis within the Peruvian and global *S. Typhimurium* populations was calculated using the pairwise similarity (inverse diversity calculation) and median pairwise similarities using the core genome SNPs and the MEGA-X tool [50]. Ggplot2 package in R (R Development Core Team, 2016) was used to visualise the results. These analyses allow estimating the diversity and ancestry of Peruvian isolates from global representative isolates.

2.8. Identification of Known Antimicrobial Resistance Genes and Single Nucleotide Variations

For each genome, the AMR-associated genes were identified in the chromosome and plasmids using ABRicate (<https://github.com/tseemann/abricate>; accessed on 4 April 2022) using CARD [51] and ARG-ANNOT [52] databases. More than 85.0% of sequence coverage and identity were considered the lower limit. Additionally, AMR Finder [53] and ResFinder [54], contain a large number of *Salmonella* spp. sequences, and were included to corroborate the results. The AMR genes were classified according to resistance mechanisms and drug class using the CARD database and manual curation [51].

To identify the SNPs in the AMR genes from the chromosomal DNA, first, we extracted the AMR gene sequences using Roary [43], followed by analysis with MAFFT v7.307 [55] for sequence alignment. Finally, SNP-sites [46] was used for the variant calling. Subsequently, we used PointFinder [56] to identify alleles and associate them with AMR.

2.9. Genotype–Phenotype Correlation

We performed the genotype–phenotype correlation (GPC) analysis using disc diffusion antimicrobial susceptibility test results in combination with the WGS-informed AMR analysis. These assays were compared with the occurrence of known AMR genes and alleles associated with the resistance to the respective drug. False-positive, false-negative, sensitivity, specificity, and accuracy of the GPC were calculated as described previously [21]. Finally, phenotypically resistant isolates that did not contain known genes for this resistance were identified as candidates for use in finding new variants that may confer resistance.

2.10. Genome-Wide Association Study to Identify New Single Nucleotide Variations Associated with Resistance Phenotype

In isolates where genotype–phenotype association did not match, we used the genome-wide association study (GWAS) approach to identify possible genes and alleles for specific AMR. A similar approach, as described by Bandoy and Weimer [57], was used for the GWAS analysis with a chi-square test in R (R Development Core Team, 2016) to identify mutant alleles that conferred a specific phenotype. In this process, the variant calling was performed for all the isolates using LT2 isolate as the reference. Only the phenotype observed for the ten tested drugs was considered. The Snippy v3.2 (<https://github.com/tseemann/snippy>; accessed on 16 April 2022) was used for variant calling, and the SNPs and indels were filtered considering a minimum sequencing depth > 20x and minor allele frequency less than 0.02 were removed. A significant association was considered when $p < 0.05$, and the values were automatically corrected for multiple testing using the Bonferroni method [58]. The results were visualised with the Manhattan plot in R (R Development Core Team, 2016) using the “qqman” package. To minimise the false positive association in the GWAS analysis, we applied the population structure as a covariable in Firth’s logistic regression analysis using the “logistf” v1.24 package in R (<https://github.com/vicpb1/Genetic-Architecture-of-Zika>; accessed on 16 April 2022). The population structure was predicted using principal component analysis (PCA) and PLINK v1.90b6.9 [59], considering the first six principal components (PC1–PC6) as continuous covariables.

2.11. Association of New Single Nucleotide Variations and Drug Resistance

The GWAS represent a powerful approach to identifying new genetic variants in isolates that demonstrated phenotypic drug resistance but did not contain determinants associated with known antimicrobials. We examined the potential for additional gene variants that may explain the specific drug resistance in those isolates. When found, we adopted the strategy described by Ferla et al. [57,60]. Additionally, we modelled the 3D structure of the protein harbouring the variation using the corresponding amino acid sequence and Swiss Model homology server [61]. The 3D structure was then used to predict the stability of these proteins for the new variations using the Dynamute2 tool [62]. Finally, the stability/instability property of the new allele was correlated with the observed drug resistance phenotype.

3. Results

3.1. Genomic Characterisation Shows Peruvian Salmonella Samples Belong to Typhimurium Serovar and Sequence Type ST19

Ninety WGS samples passed the quality metrics and were used for further analysis (Supplementary Table S1). The SeqSero and MLST analysis confirmed that 83 belong to serovar Typhimurium and 85 belong to sequence type ST19, respectively (Supplementary Table S1). For the global samples, the majority were serovar Typhimurium and sequence type ST19. Use of ANI analysis found the Peruvian genomes were >99.6% identical, while

the global samples ($n = 140$) were >99.4% identical (Supplementary Figure S1). These analyses confirm that both samples belong to serovar *S. Typhimurium* and use all the isolates in subsequent analyses.

3.2. Pan-Genome Structure and Nucleotide Diversity of Peruvian Samples

The pan-genome analysis examined the content of gene diversity, and the core genome was used as input data to analyse the phylogeny, population structure, and nucleotide variation within these isolates. The pan-genome of 140 *S. Typhimurium* was open ($\alpha = 0.53$) and contained 11,168 orthologous genes with 3455 core genes and 7713 accessory genes (softcore = 495, shell = 1000, and cloud = 6218) that represent the 30.9% and 69.1%, respectively (Figure 2A,B). Specifically for the Peruvian isolates ($n = 90$), the core and accessory genome constitutes 42.6% and 57.4%, respectively, where there are 7462 orthologous genes, 3181 core genes and 4281 accessory genes (softcore = 889, shell = 781, and cloud = 2611) (Figure 2C,D). We identified values > 85.0% and 70.0% of pairwise nucleotides dissimilarity (Supplementary Figure S2) between the overall and within-population nucleotide diversity to be 0.057 and 0.135 for global and Peruvian samples, respectively, indicating that our Peruvian isolates are more genetically diverse and present an open pan-genome with α value minor to 1 ($\alpha = 0.73$).

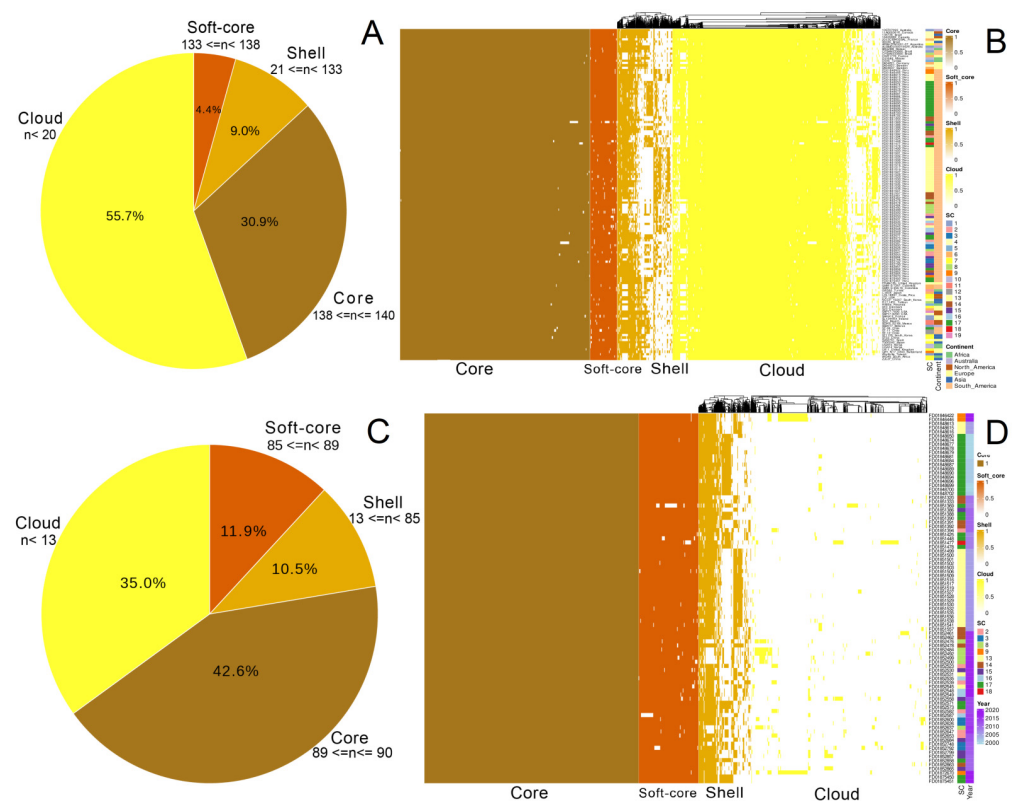


Figure 2. Pan-genome analyses of *S. Typhimurium* isolates. (A,C), Pie charts showing the proportion of repertoire genes in the core, soft-core, shell, and cloud of the pangenome of the global ($n = 140$) and Peruvian *S. Typhimurium* isolates ($n = 90$). (B,D), Gene presence-absence matrix shows the gene distribution in each genome. Heatmap legends on the right of panels (B,D) indicate the cluster sequence to which each sample belongs. The accessory genome of 69.1% and 57.4% presents a high diversity of gene content distinguished by sequence clusters (lineages) for Peruvian and global samples.

3.3. Ten Lineages of *S. Typhimurium* Classified under Two Major Clades Are Circulating in Peru

The un-rooted phylogenetic tree based on the core genome clustered similarly for both the global and Peruvian samples. The Peruvian isolates were analysed with the other global samples and contained ten distinct sub-clades (Supplementary Figure S3). It is also observed that the lineages of Peruvian isolates are distributed across the continents (Figure 3). When analysed exclusively for the 90 Peruvian isolates, the phylogenetic tree shows a similar number of sub-clades (Figure 3). Both analyses also found that the Peruvian samples are mostly distributed in two major clades. When we determined the population structure as sequence clusters (SC, assigned as lineages) by a two-level hierarchical Bayesian approach (BAPS) using the core gene SNPs, we observed at least 19 sequence clusters for the global samples and 10 sequence clusters for the 90 Peruvian samples within this global sample pool (Supplementary Figure S3). The first clade ($n = 47$) includes the sequences cluster SC13 ($n = 24$), SC14 ($n = 9$), SC15 ($n = 7$), SC16 ($n = 4$), and SC9 ($n = 3$); while the second clade ($n = 43$) includes SC2 ($n = 6$), SC3 ($n = 4$), SC8 ($n = 6$), SC17 ($n = 26$), and SC18 ($n = 1$) (Figure 3).

While we further analysed the sequence clusters only for the 90 Peruvian samples, we identified four additional sub-populations without much phylogenetic difference, where SC2 consists of three sub-sequence clusters and SC3 and SC8 had two sub-sequence clusters each (Figure 3). Therefore, ten sequence clusters or lineages are circulating in Peru. The major clonal group CG-I (SC3) consists of 24 isolates, distributed in seven different Peruvian cities, mostly isolated during 2005–2006, and closely related to a Switzerland sample. The second crucial clonal group, CG-II (SC17), consists of 26 isolates, is found in eight different Peruvian cities, isolated during 2000–2001, and is closely related to a Chilean sample (Figure 3).

3.4. The Phenotypic Profile Shows 48.9% Resistance to at least One Drug in Isolates Circulating in Peru for Ten Drugs

Out of the 90 Peruvian samples, 44 isolates (48.9%) contained resistance to at least one drug from the tested drugs using the disc diffusion assay. Out of these 44 isolates, the highest phenotypic resistance profile was for NA ($n = 18$, 40.9%; or 20.0% considering total 90 isolates), TE ($n = 17$, 38.6% or 18.9% considering total 90 isolates), AM ($n = 14$, 31.8%; or 15.6% considering total 90 isolates), N ($n = 13$, 29.6%; or 14.4% considering total 90 isolates), and 11 samples (25.0%; or 12.0% considering total 90 isolates) show MDR (Supplementary Table S1, Figure 4). These MDR isolates mostly belong to SC8 ($n = 5$), followed by SC9 ($n = 2$), SC15 ($n = 2$), SC17 ($n = 1$). In sample collection site-based analysis, Lima shows most ($n = 10$) of the MDR isolates and only one from Huánuco (Supplementary Table S1).

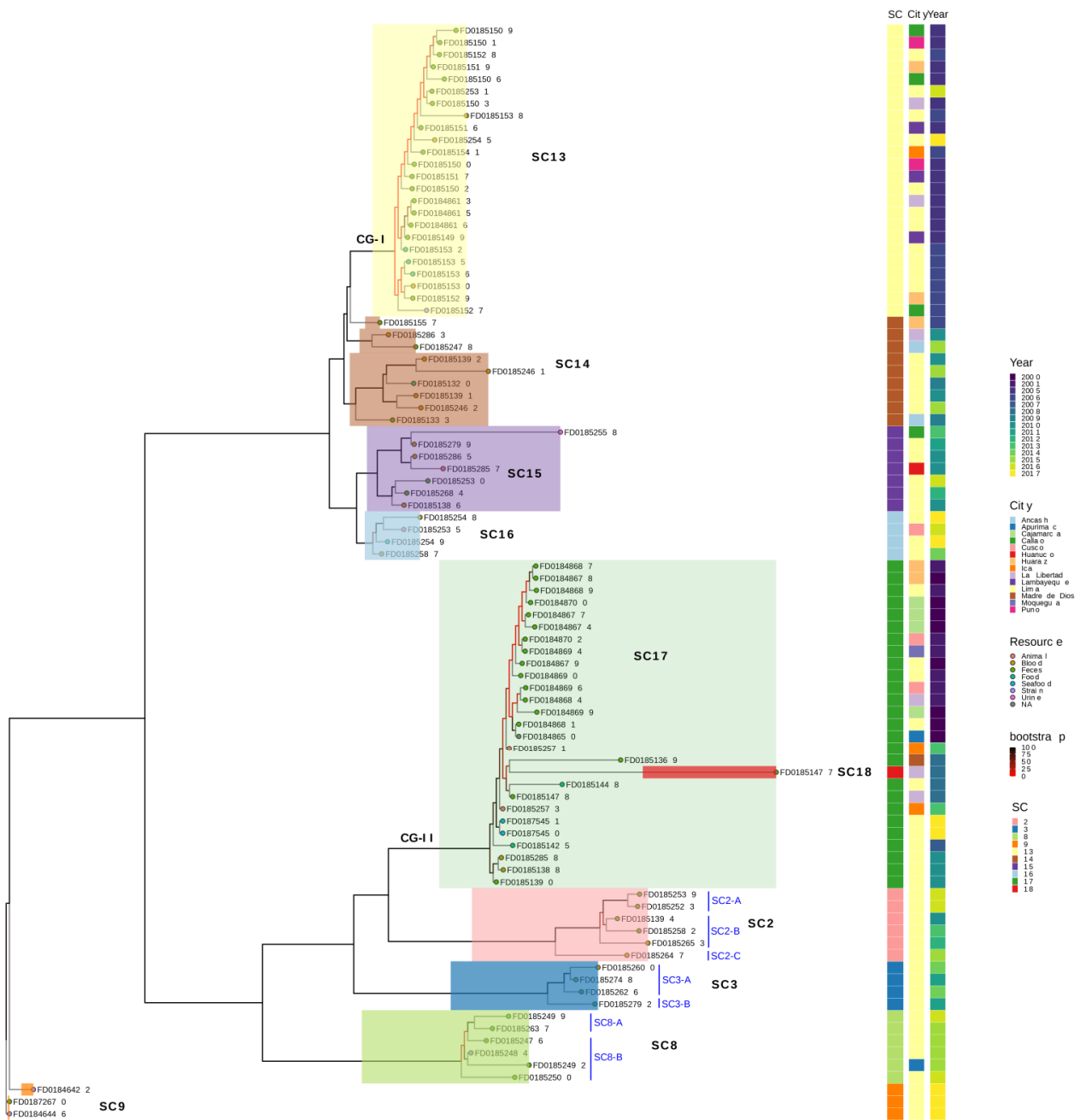


Figure 3. The phylogenetic tree was generated using a maximum likelihood method with 1000 replicates of bootstrap using GTR + GAMMA to estimate the evolutionary distance between Peruvian isolates ($n = 90$). The phylogenetic tree was clustered into at least two large clades and separated into nine sub-clades. Each sub-clade corresponds to a population group, except for SC18. Two emerging clades (CG-I and CG-II) are also found. Additionally, we identified subgroups based on the prediction of only the Peruvian population structure, but they did not show the phylogenetic distinction.

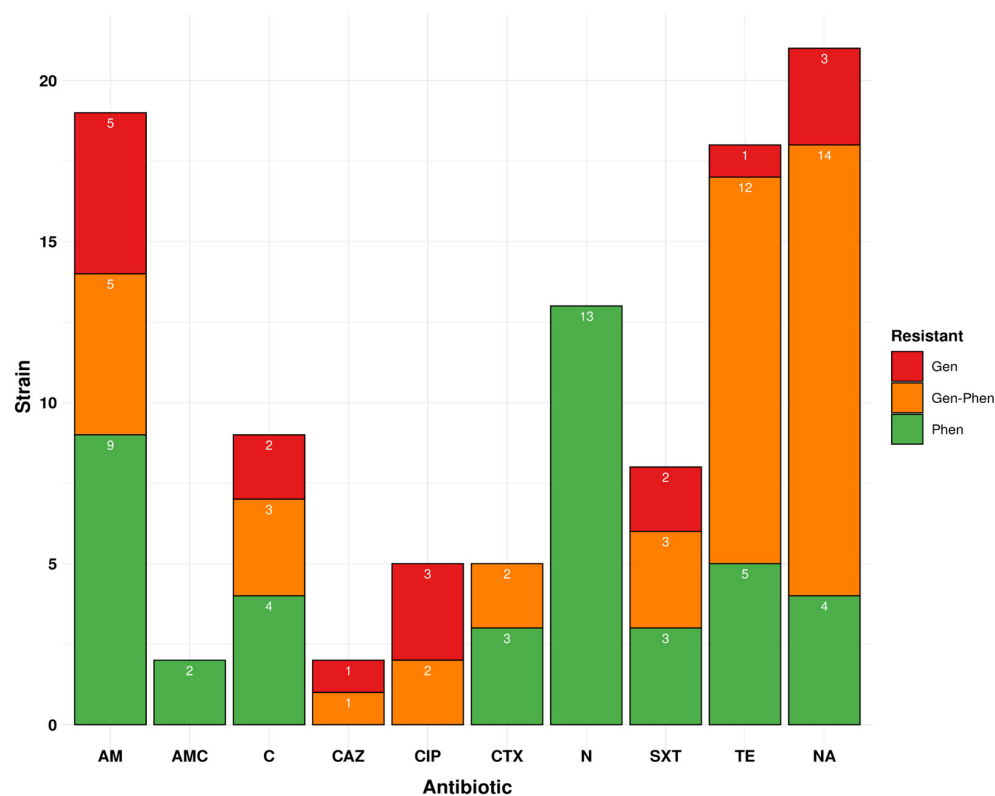


Figure 4. Individual antibiotic resistance profile of Peruvian isolates and their genotype–phenotype correlations for our ten tested antibiotics. Antibiotic abbreviation: ampicillin (AM), chloramphenicol (C), ciprofloxacin (CIP), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), cefotaxime (CTX), nalidixic acid (NA), amoxicillin-clavulanate (AMC), nitrofurantoin (N), tetracycline (TE), and ceftazidime (CAZ). AMR profile abbreviation: Gen, genotypic; Phen, phenotypic; Gen-Phen, genotypic-phenotypic.

3.5. Genotypic Profile Showed 31.0% of Drug Resistance Isolates Are Circulating in Peru

The genotypic profile for 90 isolates showed the presence of a total of 63 (chromosomal + plasmid) different AMR genes as per drug class and resistance mechanisms. We found 31 were chromosomal, 32 were acquired in the 90 samples (Supplementary Table S3). However, since we have only the DNA sequence data, we over-ruled the expression-based drug resistance mechanism and have considered only the genes that confer drug resistance if it is present or when alleles were present. Based on these criteria, we found 19 isolates containing mobile AMR genes, two isolates harboured known single nucleotide variations in chromosomal AMR genes that conferred drug resistance, and seven isolates contained both the mobile AMR gene as well as variations in chromosomal AMR genes (Supplementary Table S3). Therefore, 28 isolates (31.0%) showed resistance to at least one drug gene/variation, including an untested drug.

While we considered the use of 10 antibiotics and DNA-based criteria, we found 26 isolates that have at least one AMR gene/variation in the genome. Out of these 26 isolates, 17 isolates contained mobile AMR genes, two isolates had known variations in chromosomal AMR genes, and seven isolates had both the mobile AMR gene and variations in chromosomal AMR genes (Supplementary Table S3). In this analysis, the resistance genotypic profile was observed: nalidixic acid was ($n = 17$, 65.4% or 18.9% considering total 90 isolates), tetracycline ($n = 13$, 50.0% or 14.4% considering total 90 isolates), and ampicillin ($n = 10$, 11.0%) (Figure 4). These MDR isolates mostly belong to SC8 ($n = 5$) and SC9 ($n = 3$) (Supplementary Table S3). The details of the mobile AMR gene and variations in chromosomal AMR genes of our samples are given in Table 1 and Table S3.

Table 1. The genotype to phenotype concordance using accuracy, sensitivity, and specificity for Peruvian isolates for ten tested drugs.

Antibiotic	New Variations in Chromosomal Genes	Known Variations in Chromosomal Genes	Mobile Resistance Genes	Susceptible Phenotype		Resistant Phenotype		Accuracy (TP + TN)/TOTAL	Sensitivity TP/(TP + FN)	Specificity TN/(TN + FP)
				Resistant Genotype	Susceptible Genotype	Resistant Genotype	Susceptible Genotype			
				FP	TN	TP	FN			
Tetracycline (T)	-	-	<i>tetA</i> (n = 15), <i>tetB</i> (n = 2), <i>tetD</i> (n = 3), <i>tetR</i> (n = 4)	1	72	13	5	94.4%	72.2%	98.6%
Ampicillin (AM)	-	-	<i>blaTEM-176</i> (n = 1), <i>blaTEM-181</i> (n = 9), <i>blaSHV-134</i> (n = 1), <i>blaTEM-181</i> (n = 1), <i>blaCTX-M-15</i> (n = 1)	5	71	5	9	84.4%	35.7%	93.4%
Amoxicillin-clavulanate (AMC)	<i>ompA</i> (n = 90), <i>ampH</i> (n = 46), <i>golS</i> (n = 90), <i>mdsA</i> (n = 87), <i>mdsB</i> (n = 90), <i>mdsC</i> (n = 69)	-	<i>blaCTX-M-15</i> (n = 1), <i>blaSHV-12</i> (n = 1), <i>blaSHV-134</i> (n = 1)	2	86	0	2	95.6%	0.0%	97.7%
Cefotaxime (CTX)	-	-	<i>blaCTX-M-15</i> (n = 1), <i>blaSHV-12</i> (n = 1), <i>blaSHV-134</i> (n = 1)	0	85	2	3	96.7%	40.0%	100.0%
Ceftazidime (CAZ)	-	-	-	1	88	1	0	98.9%	100.0%	98.9%
Chloramphenicol (C)	<i>golS</i> (n = 90), <i>mdsA</i> (n = 87), <i>mdsB</i> (n = 90), <i>mdsC</i> (n = 69)	-	<i>florR</i> (n = 5)	2	81	3	4	93.3%	42.9%	97.6%
Ciprofloxacin (CIP)	<i>mdtK</i> (n = 90), <i>crp</i> (n = 90), <i>emrA</i> (n = 90), <i>emrB</i> (n = 87) [p.C509D, G510D (n = 1)], <i>emrR</i> (n = 90), <i>gyrB</i> (n = 89) p.S347P (n = 1), <i>parC</i> (n = 89) [p.A554T (n = 3), p.R360H, R365H (n = 1), p.T571S (n = 1)]	<i>gyrA</i> (n = 90) p.S83Y (n = 6), p.S83F (n = 1), p.D87G (n = 1), p.D87Y (n = 1)	<i>qnrB5</i> (n = 8), <i>qnrE2</i> (n = 3), <i>qnrB19</i> (n = 2)	3	85	2	0	96.7%	100.0%	96.6%
Nalidixic acid (NA)	-	-	-	3	69	14	4	92.2%	77.8%	95.8%
Trimethoprim-sulfamethoxazole (STX)	-	-	<i>dfp1</i> (n = 5), <i>dfp12</i> (n = 2), <i>dfp14</i> (n = 1), <i>sul2</i> (n = 4), <i>sul3</i> (n = 5)	2	84	3	3	96.7%	50.0%	97.7%
Nitrofurantoin (N)	<i>nfsA</i> (n = 90), <i>nfsB</i> (n = 88), <i>ribE</i> (n = 89)	-	-	0	77	0	13	85.6%	0.0%	100.0%
Aminoglycoside	<i>aac(6′)-Iaa</i> (n = 90), <i>kdpE</i> (n = 74) [p.A115G, A115E (n = 2), p.L39P (n = 3), p.R81H, S100R (n = 1)]	-	<i>aac(3) Iie</i> (n = 6), <i>aph(3′)-Ia</i> (n = 4), <i>aac(3)-Iie</i> (n = 6), <i>aac(6′)-Iaa</i> (n = 2), <i>ant(3′)-IIa</i> (n = 1), <i>aph(3′)-Ib</i> (n = 7), <i>aph(6)-Id</i> (n = 6)	-	-	-	-	-	-	-
Aminocoumarin and Aminoglycoside	<i>bacR</i> (n = 90), <i>cpxA</i> (n = 86)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
aminocoumarin	<i>mdtB</i> (n = 84) [p.T69A (n = 5), p.S157A (n = 5), p.N199H (n = 1), p.R512H (n = 3), p.Q315R (n = 1), p.R590H (n = 5)], <i>mdtC</i> (n = 90) [p.T81S (n = 1), p.N113K (n = 1), p.N133D (n = 1)]	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Multiclass	<i>acrB2</i> (n = 90) [p.L332F (n = 3), p.V482A, A491T (n = 1)], <i>sdiA</i> (n = 90), <i>tolC</i> (n = 89), <i>H-NS</i> (n = 90), <i>marA</i> (n = 90), <i>acrB1</i> (n = 90) [p.T599P (n = 27), p.R418H (n = 4), p.L845F (n = 1)], <i>mdtC</i> , <i>marA</i>	-	<i>kpnH</i> (n = 3)	-	-	-	-	-	-	-
Bacitracin	<i>bacA</i> (n = 89)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitroimidazole	<i>msbA</i> (n = 90)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Microcin	<i>yojI</i> (n = 90) [p.H431Y (n = 6), p.A366D (n = 2)]	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lincosamide	-	-	<i>limG</i> (n = 3)	-	-	-	-	-	-	-
Bleomycin	-	-	<i>BLMT</i> (n = 1)	-	-	-	-	-	-	-
Fosfomicin	-	-	<i>fosA3</i> (n = 1)	-	-	-	-	-	-	-
Colistin	-	-	<i>mcr-1</i> (n = 3)	-	-	-	-	-	-	-

3.6. Ciprofloxacin and Ceftazidime Resistance Shows the Best Genotype–Phenotype Correlation, but Nitrofurantoin Does Not

While we compared our genotype-based drug resistance isolates to the phenotype data for ten tested antibiotics, we observed that 22 isolates were phenotypically resistant; they did not contain a known AMR plasmid or mobile gene or any mutation in the chromosomal AMR gene. On the other hand, out of the 28 genotypically resistant isolates, four isolates did not demonstrate phenotypically correlation to NA ($n = 2$), multi-drug resistance ($n = 2$) and additional drugs not testing ($n = 2$). Therefore, we considered a total of 50 isolates (44 phenotypically and 4 genotypically resistant to 10 tested drugs, and 2 genotypically resistant to untested antibiotics) for our further analysis (Table 2).

While we considered the genotype and phenotype data for ten drugs, 22 ($n = 44$ –22) isolates had no correlation between the genotype and phenotype. In these 22 phenotypically drug-resistant isolates, ten isolates showed resistance exclusively to N, 3 to AM, 2 to CTX, and one each to NA, TE, AMC, AM + N, AM+ CTX+ C, AM + C+ TE, and AM+ SXT (Table 2, Supplementary Table S3). According to our calculation, as described in the method, the genotype–phenotype correlations for the ten tested antibiotics, the accuracy was 84.4% to 98.9%, specificity is between 93.4% and 100.0%, and the sensitivity reached up to 100.0% only for ciprofloxacin and ceftazidime resistance (Table 1). Ciprofloxacin and ceftazidime show >96.0% accuracy, specificity, sensitivity, and the lowest values were for beta-lactam resistance, followed by chloramphenicol and trimethoprim-sulfamethoxazole. In addition to that, we did not obtain a good sensitivity for nitrofurantoin as most of the phenotypical nitrofurantoin resistance isolates do not have any known nitrofurantoin resistance marker (Table 1).

3.7. Seventeen Different Plasmids Carrying 30 AMR Genes Were Identified in Peruvian Isolates

We identified a total of 47 different plasmids in the 90 Peruvian isolates of which 30 plasmids did not carry any AMR gene, while 17 contained at least one AMR gene. A total of 30 AMR genes were found in the 17 plasmids from 28 isolates. A maximum occurrence of eight AMR genes was found in one plasmid (IncHI2A family, isolate-FD01846422) (Supplementary Table S4). These isolates mainly belong to SC9, SC2 and SC8 lineages. Among the 90 isolates, 83 isolates had the IncFIB virulence plasmid, and this IncFIB plasmid was observed in all the sequencing clusters except the isolates that belong to SC18 and one isolate under SC2 (Supplementary Table S1, Figure 5). The details of the isolates and their corresponding plasmid AMR genes are given in Table 3 and Table S4.

In addition, we detected plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporin, IncI-gamma/k1_P7 plasmid ($n = 1$ /SC8) carrying *bla*_{CTX-M-15} gene and IncI1-I(Alpha)_P14 plasmid ($n = 1$ /SC3), *bla*_{SHV-12} and *bla*_{SHV-134} genes (Supplementary Table S4). Eleven isolates ($n = 5$ /SC8, $n = 3$ /SC2, $n = 2$ /SC16, and $n = 1$ /SC13) showed presence of Col(pHAD28) plasmid carrying fluoroquinolone-resistant either *qnrB19* or *qnrB5* gene. The fluoroquinolone-resistant *qnrE2* gene was found in three isolates belonging to the SC9 group that contained the IncHI2_P1 plasmid (Supplementary Table S4). Another critically important antibiotic-resistant gene, *fosA3*, for fosfomycin was identified in IncFIB(pN55391)_P12 ($n = 1$ /SC15), and *mcr-1* gene for colistin resistance was found in IncHI2_P1 ($n = 1$ /SC9), IncI2_P3 ($n = 2$ /SC9) (Supplementary Table S4).

Table 2. Profile of 50 Peruvian drug resistance isolates (44 phenotypically and 4 genotypically resistant to 10 tested drugs, and 2 genotypically resistant to untested antibiotics).

SC	Isolate	Resistance Genes Profile	Resistance Plasmids Profile	Resistance Phenotypic Profile	Institution/Hospital	City	Year
SC9	FD01846446	<i>tetA, tetD, sul3, linG, floR, dfrA12, blaTEM-181, qnrE2, mcr-1, aph(6)-Ia, aph(3'')-Ib, aadA2, dfrA1</i>	IncHI2_P1, IncI2_P3, P6, P8, IncFIB(S)_P11	-	Hospital Emergencias Pediátricas	Lima	2017
	FD01846422	<i>tetA, tetD, sul3, linG, floR, dfrA12, blaTEM-181, qnrE2, mcr-1, aph(6)-Ia, aph(3'')-Ib, aadA2, dfrA1, sul2</i>	IncHI2_P1, P6	NA, C, SXT, TE	Hospital Emergencias Pediátricas	Lima	2017
	FD01872670	<i>tetA, tetD, sul3, linG, floR, dfrA12, blaTEM-181, qnrE2, mcr-1, aph(6)-Ia, aph(3'')-Ib, aadA2, dfrA1, sul2, tetR</i>	IncHI2_P1, IncI2_P3, P6, P8, IncFIB(S)_P11	NA, C, SXT, TE	Hospital Emergencias Pediátricas	Lima	2017
SC8	FD01852492	<i>aac(3)-Iie, blaTEM-181, gyrA p.S83Y, aph(3'')-Ib, dfrA1, floR, qacL, sul3, qnrB5, ANT(3'')-Iia, blaTEM-176</i>	P4, IncI-gamma/K1_P7, P6, Col(pHAD28)_P13	NA, N	LRR Apurimac	Apurimac	2015
	FD01852476	<i>aac(3)-Iie, blaTEM-181, gyrA p.S83Y, aph(3')-Ia, tetA, qnrB19, blaCTX-M-15</i>	P4, IncI-gamma/K1_P7, P10, Col(pHAD28)_P13, P16	NA, TE, AM, CTX, CAZ	INSN	Lima	2015
	FD01852484	<i>aac(3)-Iie, blaTEM-181, gyrA p.S83Y, aph(3')-Ia, dfrA1, floR, qacL, sul3</i>	P4, P6, IncI-gamma/K1_P7, Col(pHAD28)_P13	NA, C, SXT	Hospital Emergencias Pediátricas	Lima	2015
	FD01852637	<i>aac(3)-Iie, blaTEM-181, gyrA p.S83Y, tetA, qnrB5</i>	P9, Col(pHAD28)_P13	NA, CIP, TE, AM	Hospital Emergencias Pediátricas	Lima	2015
	FD01852500	<i>aac(3)-Iie, blaTEM-181, gyrA p.S83Y, aph(3')-Ia, tetA</i>	P4, P15, P16	NA, TE, AM	INSN	Lima	2016
	FD01852499	<i>aac(3)-Iie, blaTEM-181, gyrA p.S83Y, qnrB19</i>	P4, Col(pHAD28)_P13	NA, CIP, AM, AMC	Hospital Emergencias Pediátricas	Lima	2016

Table 2. Cont.

SC	Isolate	Resistance Genes Profile	Resistance Plasmids Profile	Resistance Phenotypic Profile	Institution/Hospital	City	Year
SC2	FD01852647	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, sul2, tetA, tetR</i>	P2	TE	INEN	Lima	2015
	FD01852582	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, sul2, tetA, tetR</i>	P2, IncN_P17	TE	Hospital Emergencias Pediátricas	Lima	2013
	FD01851394	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, sul2, tetA</i>	P2	TE	Hospital Emergencias Pediátricas	Lima	2013
	FD01852653	<i>qnrB5, tetA, tetR</i>	Col(pHAD28)_P13, IncN_P17	NA, TE	DISA Lima Ciudad	Lima	2012
	FD01852523	<i>qnrB5, tetA</i>	IncFIB(S)_P11, Col(pHAD28)_P13	NA, TE	INEN	Lima	2016
	FD01852539	<i>qnrB5, tetA</i>	IncFIB(S)_P11, Col(pHAD28)_P13	NA, TE, AM, C, SXT	Hospital Emergencias Pediátricas	Lima	2016
SC18	FD01851477	<i>aph(3')-Ia, dfrA14</i>	IncFIB(pN55391)_P12	NA	DIRESA Trujillo	La Libertad	2008
SC16	FD01852549	<i>qnrB5, gyrA p.S83F</i>	Col(pHAD28)_P13	NA	UNMSM	Lima	2017
SC16	FD01852587	<i>gyrA p.D87Y</i>	-	NA	INEN	Lima	2014
SC14	FD01852461	<i>gyrA p.D87Y</i>	-	NA	INEN	Lima	2015
SC16	FD01852535	<i>qnrB5</i>	Col(pHAD28)_P13	-	Cusco	Cusco	2016
SC13	FD01852545	<i>qnrB5</i>	Col(pHAD28)_P13	-	INEN	Lima	2017
SC15	FD01852865	<i>sul2, tetB, aac(6')-Ian</i>	IncC_P5	AM, C, TE	Hospital Dos de Mayo	Lima	2010
	FD01852857	<i>sul2, tetB, aac(6')-Ian</i>	IncC_P5	STX, NA, TE, N	DIRESA Huanuco	Huanuco	2010
	FD01852558	<i>fosA3</i>	IncFIB(pN55391)_P12	NOT TESTED	DIRESA Callao	Callao	2013
	FD01852530	<i>KpnH</i>	-	SXT, NA	INEN	Lima	2016
SC13	FD01851538	<i>KpnH</i>	-	N	INEN	Lima	2016
SC3	FD01852748	<i>blaSHV-12, blaSHV-134</i>	IncI1-I(Alpha)_P14	AM, CTX	INEN	Lima	2011
	FD01852600	<i>aph(3')-Iia, BLMT</i>	IncI1-I(Alpha)_P14	NOT TESTED	INEN	Lima	2014
SC17	FD01851425	-	-	NA	CENAN/INS	Lima	2007
SC16	FD01852548	-	-	TE	Hospital Emergencias Pediátricas	Lima	2017

Table 2. Cont.

SC	Isolate	Resistance Genes Profile	Resistance Plasmids Profile	Resistance Phenotypic Profile	Institution/Hospital	City	Year
SC13	FD01851503	-	-	N	DIRESA Trujillo	La Libertad	2005
	FD01848616	-	-	N	LIMA CIUDAD	Lima	2005
	FD01851500	-	-	N	Puno	Puno	2005
	FD01851509	-	-	N	Direccion de Salud I	Callao	2005
	FD01851516	-	-	N	LRR Chiclayo	Lambayeque	2005
	FD01851519	-	-	N	Huaraz	Huaraz	2005
	FD01851527	-	-	N	Direccion de Salud I	Callao	2006
	FD01851529	-	-	N	Huaraz	Huaraz	2006
	FD01851530	-	-	N	INEN	Lima	2006
	FD01851538	-	-	N	LIMA	Lima	2006
SC17	FD01848677	-	-	CTX	Cajamarca	Cajamarca	2000
	FD01848679	-	-	CTX	LIMA ESTE	Lima	2000
	FD01851388	-	-	AM	INEN	Lima	2010
SC15	FD01851386	-	-	AM	Hospital Emergencias Pediátricas	Lima	2010
SC13	FD01851541	-	-	AM	Hospital Santa Maria Del Socorro	Ica	2006
SC14	FD01851320	-	-	AMC	CENAN/INS	Lima	2009
SC13	FD01851499	-	-	AM, N	LRR Chiclayo	Lambayeque	2005
SC13	FD01848615	-	-	AM, SXT	Hospital San Bartolomé	Lima	2005
SC17	FD01852858	-	-	AM, C, TE	DISA Lima Ciudad	Lima	2010
SC17	FD01848690	-	-	AM, C, CTX	Hospital San Bartolomé	Lima	2001

Antibiotic abbreviation: ampicillin (AM), chloramphenicol (C), ciprofloxacin (CIP), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), cefotaxime (CTX), nalidixic acid (NA), amoxicillin-clavulanate (AMC), nitrofurantoin (N), tetracycline (TE), and ceftazidime (CAZ).

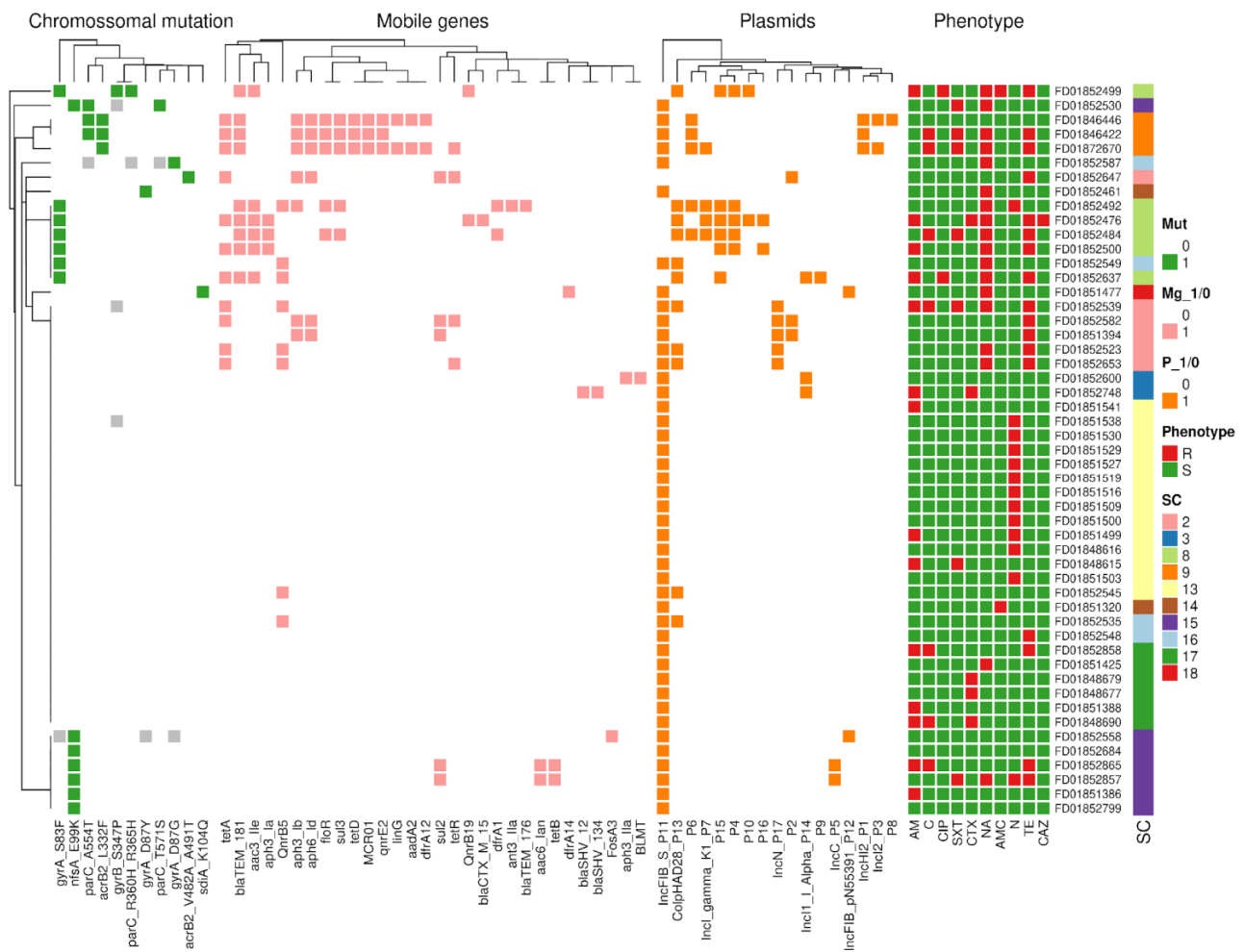


Figure 5. Heatmap showing presence and absence of antimicrobial resistance (due to chromosomal AMR gene variations, mobile genes, and plasmids), their corresponding phenotype, and sequence cluster classification in 50 *Salmonella* Typhimurium isolates.

3.8. Hospital Emergencias Pediátrica Shows the Presence of Most of the MDR Isolates in Peru

Out of the 26 genotypically AMR isolates, 21 were from Lima, and 1 was from Apurímac, La libertad, Callao, Huanuco, and Cusco. Of these twenty-one AMR isolates from Lima, ten are MDR isolates, with seven found at Hospital Emergencias Pediátrica, two found at Instituto Nacional de Salud del niño, and one is present in LRR Apurímac. Out of the phenotypically resistant 44 isolates, 12 were MDR (Lima $n = 11$, Huanuco $n = 1$). From these twelve MDR isolates, six isolates were from Lima, Hospital Emergencias Pediátrica, two were from Instituto Nacional de Salud del niño and another four MDR isolates were distributed in four different hospitals in Lima. AM, NA and TE resistance were the most prevalent in these MDR isolates. Three isolates showed phenotypic resistance to maximum five antibiotics (FD01852539: AM + C + SXT + NA + TE; FD01852476: AM + CTX + NA + TA + CAZ; and FD01852499: AM + CIP + NA + AMC + TE) and were prevalent at Hospital Emergencias Pediátrica and Instituto Nacional de Salud del niño. Importantly, we also found that *Salmonella* acquired MDR genes after 2015 (Tables 2 and S3).

3.9. Probable NA Resistance New Single Nucleotide Variations from Core AMR Gene Analysis

Based on the core genome analysis, we identified 30 non-reported non-synonymous single nucleotide variations (SNVs) in 11 AMR genes in our samples. Among these, four aminoglycoside resistance genes (*acrB1*, *kdpE*, *mdtB*, *mdtC*) had 17 SNVs and the

microcin resistance gene (*yojI*) showed two SNVs. However, we were unable to proceed with these variations as we did not perform the phenotypic tests for these drugs (Supplementary Tables S3 and S5). The other 11 new SNVs detected in 6 AMR genes (*emrB*, *parC*, *gyrB*, *acrB2*, *sdiA*, *nfsA*) are associated with fluoroquinolone, multiclass, and nitrofurantoin resistance were selected for further analysis. The isolates that showed a specific drug resistance phenotype but had no known marker for that phenotype but had a new variation were selected. Following this strategy, finally, a total of three SNVs in two genes *parC* (A554T, T571S for NA), and *sdiA* (K104Q for NA), were selected for structure-based functional annotation (Supplementary Table S5).

3.10. Probable Nitrofurantoin Resistance Eight New Genes and Their Variations from GWAS Analysis

Out of the 44 phenotypically resistant isolates, 13 isolates showed N resistance but had no known AMR markers for N. Therefore, in the GWAS analysis, we focused on these 13 isolates to predict the potential causal SNVs associated with N resistance. We observed eight non-synonymous substitution variations in eight different genes in eleven isolates that were significantly associated with N resistance ($p < 0.0000526$). It is also important to note that these 11 isolates belong to SC13, and the SC13 group had 24 isolates. Therefore, any SC13 isolate containing all eight variations has a 46.0% chance of showing the N-resistant phenotype. The SNVs were MdtH L15P, hypothetical protein G6V, QseC1 L19V, PpnN R116C, BioH A236T, WecA B284I, PurA A103G, and Tsr2 D161G. The details of these genes and SNVs are provided in Table 3. The first logistic regression-based negative results (false positive) of N resistance association are shown in Supplement Table S6.

Table 3. Potential nitrofurantoin resistance eight genes and their SNVs identified with GWAS.

Locus	Gene	Product	Effect	p-Value
NC_003197.2:1252216	<i>mdtH</i>	Multi-drug resistance protein MdtH	missense_variant c.44T > C p. Leu15Pro	1.85112239616509e-06
NC_003197.2:2585776		hypothetical protein	missense_variant c.17G > T p. Gly6Val	3.9922233235481e-06
NC_003197.2:2933724	<i>qseC_1</i>	Sensor protein QseC	missense_variant c.55A > C p. Ile19Leu	1.85112239616509e-06
NC_003197.2:3119194	<i>ppnN</i>	Pyrimidine/purine nucleotide 5'-monophosphate nucleosidase	missense_variant c.346C > T p. Arg116Cys	1.85112239616509e-06
NC_003197.2:3667964	<i>bioH</i>	Pimeloyl-[acyl-carrier protein] methyl ester esterase	missense_variant c.706G > A p. Ala236Thr	1.85112239616509e-06
NC_003197.2:4127935	<i>wecA</i>	Undecaprenyl-phosphate alpha-N-acetylglucosaminyl 1-phosphate transferase	missense_variant c.850G > A p. Val284Ile	1.85112239616509e-06
NC_003197.2:4609418	<i>purA</i>	Adenylosuccinate synthetase	missense_variant c.308C > G p. Ala103Gly	1.85112239616509e-06
NC_003197.2:4790581	<i>tsr_2</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein I	missense_variant c.482A > G p. Asp161Gly	1.85112239616509e-06

3.11. Functional Annotation of Nalidixic Acid and Nitrofurantoin Resistance Possible New Variations

We tested the effect of the newly identified three SNVs from two core AMR genes (for NA resistance) and eight new SNVs from eight genes (N resistance) from our GWAS analysis following the methods we described.

We determined the 3D structure of all these proteins, except the hypothetical protein and *tsr_2*. Therefore, we succeed in checking the effect of twelve new SNVs in nine genes (Supplementary material S1). Out of the four known fluoroquinolone resistance SNVs in *gyrA*, we found three SNVs that are destabilising (Table 4), indicating that many of the variations that have destabilising effects may be associated with drug resistance. Only the new SNVs for *parC* p.T571S, A554T, and *sdiA* p.K104Q were present in strains phenotypically resistant to NA and N, respectively, with no other known resistance gene. While we tested the effect of the identified unknown SNVs in other genes, except *ppnN* p.R116C, all 11 new SNVs were found to destabilise their corresponding protein. Therefore, considering the destabilising effect of the *gyrA* mutations, we may conclude that our identified new SNVs may be associated with NA and N resistance (Table 4).

Table 4. Most of the non-synonymous variations for the NA and N resistance are predicted to be destabilising based on $\Delta\Delta G$ (Kcal/mol) calculation.

Analysis	Gene	Non-Synonymous Variations	Isolates	Prediction Stability $\Delta\Delta G$ (Kcal/mol)	Stability	Antibiotic Resistance	
Variants in core AMR genes	<i>parC</i>	A554T	3	−1.82	Destabilising	Fluoroquinolone (NA, CIP)	
		R360H, R365H	1	−1.86	Destabilising		
		T571S, A554T	1	−1.01	Destabilising		
	<i>gyrA</i>	D87G	1	−0.84	Destabilising		
		D87Y	1	0.18	Stabilising		
		S83F	1	−0.85	Destabilising		
		S83Y	6	−0.91	Destabilising		
	<i>sdiA</i>	K104Q	1	−0.18	Destabilising		Multiclass
	<i>nfsA</i>	E99K	7	−0.61	Destabilising		
	New SNPs using GWAS	<i>mdtH</i>	L15P	24	−1.34		Destabilising
hypothetical protein		G6V	24	-	-		
<i>qseC_1</i>		I19L	24	−0.09	Destabilising	Nitrofurantoin	
<i>ppnN</i>		R116C	24	0.24	Stabilising		
<i>bioH</i>		A236T	24	−1.04	Destabilising		
<i>wecA</i>		V284I	24	−0.47	Destabilising		
<i>purA</i>		A103G	24	−1.19	Destabilising		
<i>tsr_2</i>		N161G	24	-	-		

4. Discussion

Our study is the first using WGS analysis and antimicrobial susceptibility test (AST) of *S. Typhimurium* isolates ($n = 90$) between 2000 and 2017 from different cities in Peru to examine the diversity, WGS-AST correspondence, resistome profile, and emerging lineages. Our study concludes that a considerable nucleotide, gene, and phylogenetic group diversity circulates in Peru.

Peruvian samples belong predominant to ST19, with a diverse accessory content, constituted by plasmids and segregated by phylogenetic groups. We reported that 94.4% of *S. Typhimurium* isolates in Peru belong to sequence type ST19. This was expected because ST19 is among the most predominant ST associated with gastroenteritis cases worldwide, and it is the most ancestral and diverse phylogenetically ST for the serovar *Typhimurium* [11,19,20].

The population contained an open pan-genome with many repertoire genes for global and Peruvian isolates comparable to previous reports [19,63,64]. However, the core gene content was smaller than previously reported (3672 genes) [19] Fu et al. (3846 genes) [64]. Likewise, we defined the accessory genome as constituted of diverse plasmids without predicting other mobile elements. Other studies highlight that the composition of the accessory genome for *S. Typhimurium* is mainly based on the diversity contribution of prophage genes, up 23.4%, followed by other elements such as plasmids and mobile islands, up 13.3% [19,64]. In addition, we did not corroborate that phylogenetic groups segregate the accessory genome by PCA analysis (analysis not shown).

Initially, a low accumulation nucleotide of 400–600 SNPs was reported for the serovar [20]. Although, other studies showed a large accumulation of SNPs by isolate (1232 SNPs) [64] and a total of 62,884 SNPs for the African population [10]. These studies are comparable to the vast number of polymorphisms (3045 SNPs) within genomes circulating in Peru with a moderate median pi value (0.135) at the intrapopulation diversity level described by Pons, 1996 [65].

The phylogenetic topology showed two high-order clades and population structures identified at least 10 lineages supported by subclades with depth branches to multiple branches. This topology has already been discussed previously in studies; this includes an alpha clade basal with livestock samples with a diversity of terminal branches corresponding to clonal expansions. A distinct beta clade is characterised by multiple lineages from the vast host (including wild avian) that are deeply rooted [19,20]. Likewise, we report the emergence of SC13 and SC17 lineages by their relative widespread in the country and the prevalent MDR phenotype of SC9 and SC8 lineages. It has already been shown that subclades are under different anthropogenic selection pressures. Antibiotic use might provide the selection pressure driving the emergence of sub-lineages containing AMR genes [10,11,19,66]. MDR strains harbour variable numbers of resistant plasmids reported mainly from livestock samples and outbreaks in hospitals and foods [19,20].

S. Typhimurium presents considerable resistance to first-line antibiotics, susceptibility to cephalosporins and ciprofloxacin, and low sensitivity value of phenotypic prediction due to the unknown resistance mechanism. This study explored resistance trends, transmission, profile genotypic and phenotypic, correlation, and discovery of new genetic bases for resistance phenotypes with phylogeny. The study reports a high number of strains (48.8%) with phenotypic resistance to at least one antibiotic compared to the variable prevalence (26.0%/n = 95, 61.6%/n = 193, 37.3%/n = 3491) for NTS clinical and food samples from Peru, US, and England, respectively [21,22,67]. We found considerable resistance to first-line antibiotics (nitrofurantoin, tetracycline, nalidixic acid, and ampicillin); only 12.0% were MDR strains. The persistence of resistance to first-line antibiotics over the years in this study was expected due to the continued use of treatment in *Salmonella* [24].

Previous studies of NTS and *S. Typhimurium* strains show a significant number (24.3%–43.0%) of MDR strains to first-line antibiotics except for nitrofurantoin, and with the addition of sulphonamide, streptomycin, and chloramphenicol (in some cases) in American Latin, USA, and England [21,22,24,66,68]. This minor prevalence of MDR strains compared to other studies of NTS samples should include different serovars that present high and diverse MDR. In recent years, *S. Infantis* has been the most predominant serovar detected in clinical samples associated with high resistance to first-line antibiotics, third-generation cephalosporins [7,8], and ciprofloxacin [8,68,69]. Although 85.0% of our samples were clinical isolates, *S. Typhimurium*, compared to other serovars, still presents a reduced resistance to priority antibiotics. On the contrary, *S. Typhimurium* is a relevant pathogen in guinea pigs with distinct and moderate AMR profiles that include colistin and enrofloxacin [70], erythromycin and nitrofurantoin resistance [71]. In addition, *Salmonella* isolates from chicken meat show high quinolone resistance (enrofloxacin and NA). Currently, the resistance spectra of the MDR strains of *Salmonella* serovars have been emerging in farm animals [24]. Because quinolones, chloramphenicol, aminoglycosides, and nitrofurantoin are exhaustively used as treatment and/or prophylactic in farm animals [68,70–74],

constituting the leading resource of transmission on the emergence of resistant strains is reported.

WGS showed the content of AMR chromosomal genes with an impact on the resistance based on their expression. These AMR genes encoded most efflux pumps reported by Seribelli [11]. Complementary, we identified 32 AMR acquired genes (Table 1, this profile AMR genes were similar and minor to previous works [21–23,66,73]. These studies detecting additionally other EBSLs, ribosomal protection mechanisms, PMQR genes, phosphotransferase, efflux pump, and an acetyltransferase that confer resistance to spectrum extended beta-lactam, tetracycline, fluoroquinolone, macrolides, and phenicol, respectively. Genotypic AMR profile to priority antibiotics shows the nalidixic acid resistance associated with the presence of PMQR genes (*qnrB5*, *qnrE2*, *qnrB19*) or mutations (D87G, D87Y, S83F, S83Y) in the *gyrA* gene, and presence combined of both markers are associated with ciprofloxacin resistance [21]. Interestingly, the considerably reduced ciprofloxacin susceptibility did not exhibit these markers. This is because the efflux pump's overexpression was related to intermediate resistance [75], and the disc diffusion test did not adequately detect reduced susceptibility to fluoroquinolones [76]. In only two strains, extended-spectrum beta-lactam resistance was associated with three EBSLs genes (*blaCTX-M-15*, *blaSHV-12*, *blaSHV-134*). Additional WGS allowed the detection of genes associated with additional drug resistance as aminoglycoside, aminocoumarin, bacitracin, nitroimidazole, microcin, lincosamide, bleomycin, fosfomycin, colistin, and multiclass.

A worrying trend is an increase in resistance to treatment antibiotics (extended-spectrum cephalosporins and ciprofloxacin) for *Salmonella*. Despite them, our study shows susceptibility to ciprofloxacin and third-generation cephalosporins, reported in other works [21,22,24,66–68,73] without co-resistance to both antimicrobial classes. Whereby the use of third-generation cephalosporins for treatment in *S. Typhimurium* infections would be recommended.

WGS strategy allows monitoring and complementing the prediction of phenotypic AMR profiles [23,73]. We found good accuracy values (prediction of true positives and negatives) and specificity (the absence of known markers predicting true negatives). Comparable successful correlation values were reported, 99.0% [73], 97.8% [21], 95.4% [22], 89.9% [23], and 85.4% [69]. Nonetheless, we found the best sensitivity values to predict resistance to only ceftazidime and ciprofloxacin and the highest discrepancy values to predict resistance to beta-lactam, chloramphenicol, SXT, and nitrofurantoin. Previous work also found discord in the prediction of resistance to beta-lactams [66,73], sulfamethoxazole [23], ciprofloxacin [73] and tetracycline [66]. Due to the high number of contradictions between genotype–phenotype compared with previous reports cannot conclude that this would be an alternative method of predicting antimicrobial susceptibility.

Mismatch categories with a lower sensitivity, where an isolate is genotypically predicted to be susceptible but exhibits phenotypic resistance, highlights limitations based on sequence quality [77], partial assemblies, lack of updated AMR database, and rely on the prediction based only on the genome [12,78,79]. Continuous findings should be carried out to identify novel resistance mechanisms and be incorporated into the reference databases to maintain a high level of prediction sensitivity. Other inconsistent results support the need for combined AST strategies, such as the microdilution test, an efficient method with quantitative results [28]. This study also highlights the performance of the routine antibiotic susceptibility test and works with a balanced number of phenotypic samples and population representations [80].

The diversity of plasmid families carrying AMR genes in isolates belong to SC8 and SC9 lineages and was detected in two hospital centres considered the focus of transmission of antimicrobial resistance. WGS also allows identifying AMR genes commonly present on plasmids, primary transmission resources, and related to the emergency lineages. Here, we reported at least 17 resistant plasmid families, including conjugative and mobilisable plasmids, with the potential threat of spreading AMR genes in NTS [14,22]. These resistance plasmids belong to F, ColE, I1, C, HI1, HI2, and N families, such as a previous work of

Salmonella isolates from food animals in the USA predicted 212 resistance plasmids [22]. In Peru, a conservative virulence plasmid (pSV) in *S. Typhimurium* [67] and MDR Mega plasmid in *S. Infantis* [8] have been described. In Peru, *S. Typhimurium* isolates are prevalent that contains the virulence plasmid (pSV) [67,81]. However, the absence of plasmids in the phylogenetic group could be due to the competence with other AMR plasmids or other genetic and environmental factors that modulate the residence [81].

Interestingly, the genotypic profile is linked to family plasmid in some lineages. For example, two only strains contain replicon plasmid carrying ESBLs genes and unnamed replicon plasmid P4 carrying beta-lactamases genes in lineage SC8. Lineages S8 and SC2 harbour PMQR genes in Col(pHAD28) plasmid. Col(pHAD28) plasmids related to fluoroquinolone resistance were reported [82]. *MCR-1*-carrying IncI2 and IncHI2 belong to the SC9 lineage. These dominant mobilisable plasmids show colistin resistance [83,84]. Likewise, only a strain carries *fosA3*-carrying IncFIB plasmid. Previous studies have reported antibiotic's last line resistance as the *fosA3* gene in AMR plasmids [85] and IncFIB plasmids [86,87]. Intriguingly, SC9 isolates harbour the IncHI2 plasmid that carries many AMR genes. This plasmid is a dominant mobilisable detected among MDR *Salmonella*, playing a role in the acquisition of ARGs, and has been reported recently encoding ESBLs [10,88–90]. Thus, active surveillance is needed to minimise the global spread of IncIA-I(Alpha), IncI-gamma/K1, IncFIB, IncI2, and IncHI2 resistant plasmids link an SC9, SC8, and SC2 lineage. MDR strains were found mainly from the Hospital de Emergencias Pediátricas, and Instituto Nacional de Salud del Niño. The previous report shows the presence of MDR isolates from serovar *Infantis* in the Hospital de Emergencias Pediátricas [91]. Therefore, antimicrobial screening routines should be implemented to mitigate the spread of these healthcare-associated MDR strains in Peruvian hospitals.

GWAS analysis allows us to identify new non-synonymous mutations that can potentially improve resistance fitness; however other resistance confirmation strategies are necessary. We reported new SNVs in *parC* p.R360H, R365H gene, and *sdiA* p.K104Q that show destabilising effect protein with a possible impact on the protein function. Mutations in *gyrA-parC* genes decrease the binding affinity of quinolones with DNA-topoisomerase enzymes [92,93]. Efflux pumps are encoded in chromosomes and play intrinsic roles in multi-drug resistant Gram-negative bacteria [25]. *sdiA* gene acts as a positive regulator of the constitutive expression of the AcrAB–TolC pump system [94]. Nucleotide variations in this regulator [25] act in high-level fluoroquinolone resistance and other antimicrobials [94,95]. Genetic variation targets could result in overexpression of these proteins. For instance, SNVs in *acrR* regulator or multi-drug pump AcrAB were associated with high-level fluoroquinolone resistance [94].

We found that considerable nitrofurantoin resistance could not be associated with known AMR markers such as those previously reported [96]. This would happen because the ARM databases have few AMR genes since the mechanisms of action of nitrofurans are poorly studied [94]. Thereby, GWAS analysis identified eight non-synonymous substitutions potentially associated with resistance to nitrofurantoin; six show the destabilising effect protein. Genetic variation is within multi-drug efflux pump [97]; regulator purine homeostasis and biosynthesis [98]; biotin ring assembly [99]; pathway LPS O-antigen biosynthesis [100], and chemotactic-signal transducers added. However, we did not find that the mutational effect on these functional mechanisms could confer nitrofurantoin resistance. Likewise, these variants were present in the lineage SC13. To avoid spurious associations, GWAS analysis using the population stratification covariate was performed subsequently without associating any mutation to nitrofurantoin resistance. Hence, we suggest that the maintenance of these combined mutations in phylogenetic group strains would be fixed randomly and consequently could confer a resistance advantage.

5. Conclusions

Our work based on the WGS analysis has allowed us to understand the dynamics and determinants of antimicrobial resistance distinguished by the population diversity

for *S. Typhimurium*. However, due to low sensitivity values from genotype–phenotype resistance correlation, it is still necessary to evaluate the use of WGS to predict AMR susceptibility. We recommend the third-generation cephalosporin antibiotic as a potential treatment against infection by *S. Typhimurium*. We can reinforce that WGS constitutes a complement but not an alternative to traditional methods to infer antimicrobial susceptibility, as a powerful tool that allows genome-based epidemiological study, monitoring AMR genes, virulence, plasmid typing, outbreaks, understanding of resistance mechanism, and transmission patterns. Pathogen genomic surveillance should be expanded globally and continuously monitored for better treatment of Salmonellosis and control strategies against the disseminating AMR. Future work should be based on better discordant prediction due to the absence of AMR genes on resistance phenotypes, adding new resistance mechanisms and improving the database’s reliability, replicating assay, large-scale samples, and supplementary technical methods.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics11091170/s1>, Table S1: Epidemiological data, antimicrobial resistance profile, sequencing, typification, and genomic structure analysis from 90 *Salmonella* Typhimurium strains; Table S2: Epidemiological data, ST, and BAPS analysis from 140 *Salmonella* Typhimurium strains; Table S3: Genotypic and phenotypic resistance profiles of the 90 *Salmonella* Typhimurium strains; Table S4: AMR genes and plasmids characterization using Mob_suite; Table S5: Overview of known and new chromosomal mutations and phenotypic correspondence; Table S6: Top 20 ranked p-values from SNPs associated with nitrofurantoin resistance using Firth logistic regression; Figure S1: Whole-genome Average Nucleotide Identity (ANI) and sequence type; Figure S2: Nucleotide similarity and sequence type; Figure S3: Phylogenetic tree was generated using a maximum likelihood method with 1000 replicates of bootstrap using GTR+GAMMA to estimate evolutionary distance between 140 global isolates; Supplementary material S1: Model quality validation: The 3D structures were generated using SWISS-MODEL and evaluated using Ramachandram plot.

Author Contributions: R.H., D.B. and V.A.: conceptualised and designed the study; W.Q., R.G.G. and O.M.: collected the isolates data; W.Q. and R.G.G.: provided the genomic sequence resources for this study. R.H. and D.B.: methodology, analysed the data, interpreted results, and wrote the manuscript; M.V.C.V., B.C.W., R.P. and R.P.S.: provided technical inputs; T.J.S. and F.F.A.: validated and interpreted the results; B.C.W.: edited the manuscript; D.B.: managed the project; V.A.: supervised and provided resources and infrastructure for all bioinformatics analyses. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted within the framework of the research project “1000 genomas: filogeografía y estructura poblacional de *Salmonella enterica* en Perú, 1999–2017” which was approved by the Instituto Nacional de Salud of Peru (D.R. No. 101–2019-OGITT/INS). All procedures and methods were performed in accordance with ethical standards of the Declaration of Helsinki or comparable relevant guidelines and regulation.

Informed Consent Statement: The approval of an informed consent was waived due to the retrospective nature of this study by the Institutional Committee of Research and Ethics (IRB) of the Instituto Nacional de Salud of Peru, in accordance with the national legislation and the institutional requirements for Public Health Surveillance.

Data Availability Statement: Genome sequence data are available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Metadata for samples, including accession, are included in Table S1.

Acknowledgments: We acknowledge the support of “1000 Genomas: Filogeografía y Estructura Poblacional de *Salmonella enterica* en Peru, 1999–2017”, carried out by the Laboratorio Nacional de Referencia de Enteropatógenos, at Instituto Nacional de Salud, Peru. The authors also acknowledge the Brazilian funding agencies-CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais. RH acknowledges Eduardo Tarazona-Santos and Meddy L. Santolalla Robles from Human Genetic Diversity Laboratory, UFMG for their assistance in GWAS analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Havelaar, A.H.; Kirk, M.D.; Torgerson, P.R.; Gibb, H.J.; Hald, T.; Lake, R.J.; Praet, N.; Bellinger, D.C.; de Silva, N.R.; Gargouri, N.; et al. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Med.* **2015**, *12*, e1001923. [CrossRef]
2. Tacconelli, E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; Harbarth, S.; Mendelson, M.; Monnet, D.L.; Pulcini, C.; Kahlmeter, G.; Kluytmans, J.; Carmeli, Y.; et al. Discovery, Research, and Development of New Antibiotics: The WHO Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria and Tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 318–327. [CrossRef] [PubMed]
3. Ministry of Health/Ministerio de Salud (MINSA). Boletín Epidemiológico Del Perú. *Bol. Epidemiol. Del Perú* **2019**, *28*, SE52. Available online: <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2019/52.pdf> (accessed on 4 April 2022).
4. Ramirez-Hernandez, A.; Galagarza, O.A.; Álvarez Rodríguez, M.V.; Pachari Vera, E.; Valdez Ortiz MD, C.; Deering, A.J.; Oliver, H.F. Food Safety in Peru: A Review of Fresh Produce Production and Challenges in the Public Health System. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19*, 3323–3342. [CrossRef] [PubMed]
5. Zamudio, M.L.; Meza, A.; Bailón, H.; Martínez-Urtaza, J.; Campos, J. Experiencias En La Vigilancia Epidemiológica de Agentes Patógenos Transmitidos Por Alimentos a Través de Electroforesis En Campo Pulsado (PFGE) En El Perú. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* **2011**, *28*, 128–135. [CrossRef] [PubMed]
6. Garcia, C.; Hinostrroza, N.; Astocondor, L.; Ochoa, T.; Jacobs, J. Characterization of ESBL-Producing *Salmonella enterica* Serovar Infantis Infection in Humans, Lima, Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2019**, *101*, 746–748. [CrossRef] [PubMed]
7. Sifuentes, W.Q.; Hurtado, C.V.; Meza, A.M.; Zamudio, M.L.; Gavilan, R.G. Patterns of Resistance to Antimicrobials in Serovars of *Salmonella enterica* in Peru, 2012–2015. *Rev. Chil. Infectol.* **2020**, *37*, 395–401. [CrossRef]
8. Quino, W.; Hurtado, C.V.; Escalante-Maldonado, O.; Flores-León, D.; Mestanza, O.; Vences-Rosales, F.; Zamudio, M.L.; Gavilán, R.G. Multidrogresistencia de *Salmonella* Infantis En Perú: Un Estudio Mediante Secuenciamiento de Nueva Generación. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* **2019**, *36*, 37. [CrossRef]
9. Lan, R.; Reeves, P.R.; Octavia, S. Population Structure, Origins and Evolution of Major *Salmonella enterica* Clones. *Infect. Genet. Evol.* **2009**, *9*, 996–1005. [CrossRef]
10. Van Puyvelde, S.; Pickard, D.; Vandelanootte, K.; Heinz, E.; Barbé, B.; de Block, T.; Clare, S.; Coomber, E.L.; Harcourt, K.; Sridhar, S.; et al. An African *Salmonella* Typhimurium ST313 Sublineage with Extensive Drug-Resistance and Signatures of Host Adaptation. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4280. [CrossRef]
11. Seribelli, A.A.; Gonzales, J.C.; de Almeida, F.; Benevides, L.; Cazentini Medeiros, M.I.; dos Prazeres Rodrigues, D.; de C. Soares, S.; Allard, M.W.; Falcão, J.P. Phylogenetic Analysis Revealed That *Salmonella* Typhimurium ST313 Isolated from Humans and Food in Brazil Presented a High Genomic Similarity. *Braz. J. Microbiol.* **2020**, *51*, 53–64. [CrossRef] [PubMed]
12. Li, X.Z.; Nikaido, H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: An Update. *Drugs* **2009**, *69*, 1555–1623. [PubMed]
13. Glenn, L.M.; Lindsey, R.L.; Frank, J.F.; Meinersmann, R.J.; Englen, M.D.; Fedorka-Cray, P.J.; Frye, J.G. Analysis of Antimicrobial Resistance Genes Detected in Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolated from Food Animals. *Microb. Drug Resist.* **2011**, *17*, 407–418. [CrossRef] [PubMed]
14. Bogomazova, A.N.; Gordeeva, V.D.; Krylova, E.V.; Soltynskaya, I.V.; Davydova, E.E.; Ivanova, O.E.; Komarov, A.A. Mega-Plasmid Found Worldwide Confers Multiple Antimicrobial Resistance in *Salmonella* Infantis of Broiler Origin in Russia. *Int. J. Food Microbiol.* **2020**, *319*, 108497. [CrossRef]
15. Ellington, M.J.; Ekelund, O.; Aarestrup, F.M.; Canton, R.; Doumith, M.; Giske, C.; Grundman, H.; Hasman, H.; Holden, M.T.G.; Hopkins, K.L.; et al. The Role of Whole Genome Sequencing in Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria: Report from the EUCAST Subcommittee. *Clin. Microbiol. Infect.* **2017**, *23*, 2–22. [CrossRef] [PubMed]
16. Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibsouda, S.K. Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *J. Pharm. Anal.* **2016**, *6*, 71–79. [CrossRef]
17. World Health Organization (WHO). *GLASS Whole-Genome Sequencing for Surveillance of Antimicrobial Resistance: Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS)*; WHO: Geneva, Switzerland, 2020; ISBN 9789240011007. Available online: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/334354> (accessed on 4 April 2022).
18. Zhang, S.; Li, S.; Gu, W.; Den Bakker, H.; Boxrud, D.; Taylor, A.; Roe, C.; Driebe, E.; Engelthaler, D.M.; Allard, M.; et al. Zoonotic Source Attribution of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Using Genomic Surveillance Data, United States. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 82. [CrossRef]
19. Id, M.B.; Alikhan, N.-F.; Tan Thilliez Id, G.; Kirkwood Id, M.; Wheelerid, N.E.; Petrovska, L.; Dallman, T.J.; Adriaenssensid, E.M.; Hallid, N.; Kingsleyid, R.A. Evolution of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Driven by Anthropogenic Selection and Niche Adaptation. *PLoS Genet.* **2020**, *16*, e1008850. [CrossRef]
20. Branchu, P.; Bawn, M.; Kingsley, R.A. Genome Variation and Molecular Epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Pathovariants. *Infect. Immun.* **2018**, *86*, e00079–18. [CrossRef]
21. Neuert, S.; Nair, S.; Day, M.R.; Doumith, M.; Ashton, P.M.; Mellor, K.C.; Jenkins, C.; Hopkins, K.L.; Woodford, N.; de Pinna, E.; et al. Prediction of Phenotypic Antimicrobial Resistance Profiles from Whole Genome Sequences of Non-Typhoidal *Salmonella enterica*. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 592. [CrossRef]

22. McMillan, E.A.; Gupta, S.K.; Williams, L.E.; Jové, T.; Hiott, L.M.; Woodley, T.A.; Barrett, J.B.; Jackson, C.R.; Wasilenko, J.L.; Simmons, M.; et al. Antimicrobial Resistance Genes, Cassettes, and Plasmids Present in *Salmonella enterica* Associated with United States Food Animals. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 832. [CrossRef] [PubMed]
23. Mensah, N.; Tang, Y.; Cawthraw, S.; Abuoun, M.; Fenner, J.; Thomson, N.R.; Mather, A.E.; Petrovska-Holmes, L. Determining Antimicrobial Susceptibility in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium through Whole Genome Sequencing: A Comparison against Multiple Phenotypic Susceptibility Testing Methods. *BMC Microbiol.* **2019**, *19*, 148. [CrossRef] [PubMed]
24. Wang, X.; Biswas, S.; Paudyal, N.; Pan, H.; Li, X.; Fang, W.; Yue, M. Antibiotic Resistance in *Salmonella* Typhimurium Isolates Recovered from the Food Chain through National Antimicrobial Resistance Monitoring System between 1996 and 2016. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 985. [CrossRef]
25. Tavío, M.M.; Aquili, V.D.; Poveda, J.B.; Antunes, N.T.; Sánchez-Céspedes, J.; Vila, J. Quorum-Sensing Regulator SdiA and MarA Overexpression Is Involved in In Vitro-Selected Multidrug Resistance of *Escherichia Coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, *65*, 1178–1186. [CrossRef] [PubMed]
26. Farhat, M.R.; Freschi, L.; Calderon, R.; Ioerger, T.; Snyder, M.; Meehan, C.J.; de Jong, B.; Rigouts, L.; Sloutsky, A.; Kaur, D.; et al. GWAS for Quantitative Resistance Phenotypes in Mycobacterium Tuberculosis Reveals Resistance Genes and Regulatory Regions. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2128. [CrossRef] [PubMed]
27. Mortimer, T.D.; Zhang, J.J.; Ma, K.C.; Grad, Y.H. Loci for Prediction of Penicillin and Tetracycline Susceptibility in *Neisseria Gonorrhoeae*: A Genome-Wide Association Study. *Lancet Microbe* **2022**, *3*, e376–e381. [CrossRef]
28. Jorgensen, J.H.; Ferraro, M.J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *49*, 1749–1755. [CrossRef]
29. Perez-Sepulveda, B.M.; Heavens, D.; Pulford, C.V.; Predeus, A.V.; Low, R.; Webster, H.; Schudoma, C.; Rowe, W.; Lipscombe, J.; Watkins, C.; et al. An Accessible, Efficient and Global Approach for the Large-Scale Sequencing of Bacterial Genomes. *Genome Biol.* **2020**, *22*, 349. [CrossRef] [PubMed]
30. Andrews, S. FASTQC A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. *Babraham Inst.* **2010**. Available online: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed on 12 March 2022).
31. Wick, R.R.; Judd, L.M.; Gorrie, C.L.; Holt, K.E. Unicycler: Resolving Bacterial Genome Assemblies from Short and Long Sequencing Reads. *PLoS Comput. Biol.* **2017**, *13*, e1005595. [CrossRef]
32. Gurevich, A.; Saveliev, V.; Vyahhi, N.; Tesler, G. QUAST: Quality Assessment Tool for Genome Assemblies. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 1072–1075. [CrossRef] [PubMed]
33. Simão, F.A.; Waterhouse, R.M.; Ioannidis, P.; Kriventseva, E.V.; Zdobnov, E.M. BUSCO: Assessing Genome Assembly and Annotation Completeness with Single-Copy Orthologs. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 3210–3212. [CrossRef] [PubMed]
34. Seemann, T. Prokka: Rapid Prokaryotic Genome Annotation. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2068–2069. [CrossRef] [PubMed]
35. Hu, Z.; Wei, C.; Li, Z. Computational Strategies for Eukaryotic Pangenome Analyses. In *Pangenome: Diversity, Dynamics and Evolution of Genomes*; Tettelin, H., Medini, D., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2020; pp. 293–307. [CrossRef]
36. van Aggelen, H.; Kolde, R.; Chamarthi, H.; Loving, J.; Fan, Y.; Fallon, J.T.; Huang, W.; Wang, G.; Fortunato-Habib, M.M.; Carmona, J.J.; et al. A Core Genome Approach That Enables Prospective and Dynamic Monitoring of Infectious Outbreaks. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 7808. [CrossRef]
37. Noune, C.; Hauxwell, C. MetaGaAP: A Novel Pipeline to Estimate Community Composition and Abundance from Non-Model Sequence Data. *Biology* **2017**, *6*, 14. [CrossRef]
38. Robertson, J.; Nash, J.H.E. MOB-Suite: Software Tools for Clustering, Reconstruction and Typing of Plasmids from Draft Assemblies. *Microb. Genom.* **2018**, *4*, e000206. [CrossRef]
39. Carattoli, A.; Zankari, E.; García-Fernández, A.; Larsen, M.V.; Lund, O.; Villa, L.; Aarestrup, F.M.; Hasman, H. In Silico Detection and Typing of Plasmids Using Plasmidfinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 3895–3903. [CrossRef]
40. Zhang, S.; den Bakker, H.C.; Li, S.; Chen, J.; Dinsmore, B.A.; Lane, C.; Lauer, A.C.; Fields, P.I.; Deng, X. SeqSero2: Rapid and Improved *Salmonella* Serotype Determination Using Whole-Genome Sequencing Data. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85*, e01746-19. [CrossRef]
41. Jolley, K.A.; Bray, J.E.; Maiden, M.C.J. Open-Access Bacterial Population Genomics: BIGSdb Software, the PubMLST.Org Website and Their Applications. *Wellcome Open Res.* **2018**, *3*, 124. [CrossRef]
42. Jain, C.; Rodriguez-R, L.M.; Phillippy, A.M.; Konstantinidis, K.T.; Aluru, S. High Throughput ANI Analysis of 90K Prokaryotic Genomes Reveals Clear Species Boundaries. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5114. [CrossRef]
43. Page, A.J.; Cummins, C.A.; Hunt, M.; Wong, V.K.; Reuter, S.; Holden, M.T.G.; Fookes, M.; Falush, D.; Keane, J.A.; Parkhill, J. Roary: Rapid Large-Scale Prokaryote Pan Genome Analysis. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 3691–3693. [CrossRef] [PubMed]
44. Snipen, M.L.; Liland, K.H. Micropan: An R-package for microbial pan-genomics. *BMC Bioinform.* **2015**, *16*, 79. [CrossRef] [PubMed]
45. Tettelin, H.; Massignani, V.; Cieslewicz, M.J.; Donati, C.; Medini, D.; Ward, N.L.; Angiuoli, S.V.; Crabtree, J.; Jones, A.L.; Durkin, A.S.; et al. Genome Analysis of Multiple Pathogenic Isolates of *Streptococcus Agalactiae*: Implications for the Microbial “Pan-Genome”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13950–13955. [CrossRef]
46. Page, A.J.; Taylor, B.; Delaney, A.J.; Soares, J.; Seemann, T.; Keane, J.A.; Harris, S.R. SNP-Sites: Rapid Efficient Extraction of SNPs from Multi-FASTA Alignments. *Microb. Genom.* **2016**, *2*, e000056. [CrossRef] [PubMed]

47. Stamatakis, A. RAxML Version 8: A Tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 1312–1313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Corander, J.; Marttinen, P.; Sirén, J.; Tang, J. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinform.* **2008**, *9*, 539. [[CrossRef](#)]
49. Tonkin-Hill, G.; Lees, J.A.; Bentley, S.D.; Frost, S.D.W.; Corander, J. RhierBAPS: An R Implementation of the Population Clustering Algorithm HierBAPS. *Wellcome Open Res.* **2018**, *3*, 93. [[CrossRef](#)]
50. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [[CrossRef](#)]
51. Jia, B.; Raphenya, A.R.; Alcock, B.; Waglechner, N.; Guo, P.; Tsang, K.K.; Lago, B.A.; Dave, B.M.; Pereira, S.; Sharma, A.N.; et al. CARD 2017: Expansion and Model-Centric Curation of the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D566–D573. [[CrossRef](#)]
52. Gupta, S.K.; Padmanabhan, B.R.; Diene, S.M.; Lopez-Rojas, R.; Kempf, M.; Landraud, L.; Rolain, J.M. ARG-Annot, a New Bioinformatic Tool to Discover Antibiotic Resistance Genes in Bacterial Genomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 212–220. [[CrossRef](#)]
53. Feldgarden, M.; Brover, V.; Gonzalez-Escalona, N.; Frye, J.G.; Haendiges, J.; Haft, D.H.; Hoffmann, M.; Pettengill, J.B.; Prasad, A.B.; Tillman, G.E.; et al. AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog Facilitate Examination of the Genomic Links among Antimicrobial Resistance, Stress Response, and Virulence. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 12728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Florensa, A.F.; Kaas, R.S.; Clausen, P.T.L.C.; Aytan-Aktug, D.; Aarestrup, F.M. ResFinder—An Open Online Resource for Identification of Antimicrobial Resistance Genes in next-Generation Sequencing Data and Prediction of Phenotypes from Genotypes. *Microb. Genom.* **2022**, *8*, 000748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Katoh, K.; Kuma, K.I.; Toh, H.; Miyata, T. MAFFT Version 5: Improvement in Accuracy of Multiple Sequence Alignment. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 511–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Zankari, E.; Allesøe, R.; Joensen, K.G.; Cavaco, L.M.; Lund, O.; Aarestrup, F.M. PointFinder: A Novel Web Tool for WGS-Based Detection of Antimicrobial Resistance Associated with Chromosomal Point Mutations in Bacterial Pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* **2017**, *72*, 2764–2768. [[CrossRef](#)]
57. Bandoy, D.D.R.; Weimer, B.C. Biological Machine Learning Combined with *Campylobacter* Population Genomics Reveals Virulence Gene Allelic Variants Cause Disease. *Microorganisms* **2020**, *8*, 549. [[CrossRef](#)]
58. Lee, S.; Lee, D.K. What Is the Proper Way to Apply the Multiple Comparison Test? *Korean J. Anesthesiol.* **2018**, *71*, 353. [[CrossRef](#)]
59. Purcell, S.; Neale, B.; Todd-Brown, K.; Thomas, L.; Ferreira, M.A.R.; Bender, D.; Maller, J.; Sklar, P.; De Bakker, P.I.W.; Daly, M.J.; et al. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *Am. J. Hum. Genet.* **2007**, *81*, 559–575. [[CrossRef](#)]
60. Ferla, M.P.; Pagnamenta, A.T.; Koukouflis, L.; Taylor, J.C.; Marsden, B.D. Venus: Elucidating the Impact of Amino Acid Variants on Protein Function Beyond Structure Destabilization. *J. Mol. Biol.* **2022**, *434*, 167567. [[CrossRef](#)]
61. Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F.T.; De Beer, T.A.P.; Rempfer, C.; Bordoli, L.; et al. SWISS-MODEL: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W296–W303. [[CrossRef](#)]
62. Rodrigues, C.H.M.; Pires, D.E.V.; Ascher, D.B. DynaMut2: Assessing Changes in Stability and Flexibility upon Single and Multiple Point Missense Mutations. *Protein Sci.* **2021**, *30*, 60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Guillier, L.; Gourmelon, M.; Lozach, S.; Cadel-Six, S.; Vignaud, M.L.; Munck, N.; Hald, T.; Palma, F. AB_SA: Accessory Genes-Based Source Attribution—Tracing the Source of *Salmonella enterica* Typhimurium Environmental Strains. *Microb. Genom.* **2020**, *6*, mgen000366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Fu, S.; Hiley, L.; Octavia, S.; Tanaka, M.M.; Sintchenko, V.; Lan, R. Comparative Genomics of Australian and International Isolates of *Salmonella* Typhimurium: Correlation of Core Genome Evolution with CRISPR and Prophage Profiles. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Pettitt, R.J. Measuring and Testing Genetic Differentiation With Ordered Versus Unordered Alleles. *Genetics* **1996**, *144*, 1237–1245.
66. Almeida, F.; Seribelli, A.A.; Cazentini Medeiros, M.I.; Rodrigues, D.D.P.; De MelloVarani, A.; Luo, Y.; Allard, M.W.; Falcão, J.P. Phylogenetic and Antimicrobial Resistance Gene Analysis of *Salmonella* Typhimurium Strains Isolated in Brazil by Whole Genome Sequencing. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0201882. [[CrossRef](#)]
67. Silva, C.; Betancor, L.; Garcia, C.; Astocondor, L.; Hinojosa, N.; Bisio, J.; Rivera, J.; Perezgasga, L.; Escanda, V.P.; Yim, L.; et al. Characterisation of *Salmonella enterica* Isolates Causing Bacteremia in Lima, Peru, Using Multiple Typing Methods. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0189946. [[CrossRef](#)]
68. Quesada, A.; Reginatto, G.A.; Español, A.R.; Colantonio, L.D.; Burrone, M.S. Antimicrobial Resistance of *Salmonella* spp. Isolated Animal Food for Human Consumption. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* **2016**, *33*, 32–44. [[CrossRef](#)]
69. Viana, C.; Grossi, J.L.; Sereno, M.J.; Yamatogi, R.S.; Bersot, L.D.S.; Call, D.R.; Nero, L.A. Phenotypic and Genotypic Characterisation of Non-Typhoidal *Salmonella* Isolated from a Brazilian Pork Production Chain. *Food Res. Int.* **2020**, *137*, 109406. [[CrossRef](#)]
70. Huamán, M.; Pérez, C.; Rodríguez, J.; Killerby, M.; Lovón, S.; Chauca, L. Genetic Characterization and Antimicrobial Resistance Patterns of *Salmonella enterica* Subsp. Enterica Serovar Typhimurium in Guinea Pigs under Intensive Breeding. *Rev. Investig. Vet. Del Perú* **2020**, *31*, e17542. [[CrossRef](#)]

71. Guillermo, S.R.; Rocío, R.; Ana, C.O.; Iván, R.W.; Raúl, R.A.; Lenin, M.H. Antimicrobial Resistance and Genotyping of *Salmonella* Typhimurium Strains Isolated from Guinea Pigs (*Cavia Porcellus*) from Intensive Production Farms of the City of Lima, Peru. *Rev. Investig. Vet. Del Perú* **2018**, *29*, 319–327. [CrossRef]
72. Ríos, C.A.; Morales-Cauti, S.; Vilca, L.M.; Carhuallanqui, P.A.; Ramos, D.D. Determinación Del Perfil de Resistencia Antibiótica de *Salmonella enterica* Aislada de Cerdos Faenados En Un Matadero de Lima, Perú. *Rev. Investig. Vet. Del Perú* **2019**, *30*, 438–445. [CrossRef]
73. McDermott, P.F.; Tyson, G.H.; Kabera, C.; Chen, Y.; Li, C.; Folster, J.P.; Ayers, S.L.; Lam, C.; Tate, H.P.; Zhao, S. Whole-Genome Sequencing for Detecting Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 5515–5520. [CrossRef] [PubMed]
74. Víctor Carhuapoma, D.; Nicasio Valencia, M.; Rufino Paucar, C.; Mayhua, P.H.M.; Rodrigo Huamán, J.; Lizana-Hilario, E. Efecto de *Escherichia Coli* y *Salmonella* spp. En El Crecimiento y Mortalidad de Crías de Alpacas (*Vicugna pacos*). *Rev. Investig. Vet. Del Perú* **2019**, *30*, 946–953. [CrossRef]
75. Chang, M.X.; Zhang, J.F.; Sun, Y.H.; Li, R.S.; Lin, X.L.; Yang, L.; Webber, M.A.; Jiang, H.X. Contribution of Different Mechanisms to Ciprofloxacin Resistance in *Salmonella* spp. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 663731. [CrossRef] [PubMed]
76. Adhikari, D.; Acharya, D.; Shrestha, P.; Amatya, R. Ciprofloxacin Susceptibility of *Salmonella* Enteric Serovar Typhi and Paratyphi A from Blood Samples of Suspected Enteric Fever Patients. *Int. J. Infect. Microbiol.* **2012**, *1*, 9–13. [CrossRef]
77. Olson, N.D.; Lund, S.P.; Colman, R.E.; Foster, J.T.; Sahl, J.W.; Schupp, J.M.; Keim, P.; Morrow, J.B.; Salit, M.L.; Zook, J.M. Best Practices for Evaluating Single Nucleotide Variant Calling Methods for Microbial Genomics. *Front. Genet.* **2015**, *6*, 235. [CrossRef]
78. Liu, Z.; Niu, H.; Wu, S.; Huang, R. CsgD Regulatory Network in a Bacterial Trait-Altering Biofilm Formation. *Emerg. Microbes Infect.* **2014**, *3*, e1. [CrossRef]
79. Hughes, D.; Andersson, D.I. Environmental and Genetic Modulation of the Phenotypic Expression of Antibiotic Resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, 374–391. [CrossRef]
80. Urmi, U.L.; Nahar, S.; Rana, M.; Sultana, F.; Jahan, N.; Hossain, B.; Alam, M.S.; Mosaddek, A.S.M.; McKimm, J.; Rahman, N.A.A.; et al. Genotypic to Phenotypic Resistance Discrepancies Identified Involving β -Lactamase Genes, bla KPC, bla IMP, bla NDM-1, and bla VIM in Uropathogenic *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Drug Resist.* **2020**, *13*, 2863–2875. [CrossRef]
81. Silva, C.; Puente, J.L.; Calva, E. *Salmonella* Virulence Plasmid: Pathogenesis and Ecology. *Pathog. Dis.* **2017**, *75*, ftx070. [CrossRef]
82. Tate, H.; Li, C.; Nyirabahizi, E.; Tyson, G.H.; Zhao, S.; Rice-Trujillo, C.; Jones, S.B.; Ayers, S.; M'Ikanatha, N.M.; Hanna, S.; et al. A National Antimicrobial Resistance Monitoring System Survey of Antimicrobial-Resistant Foodborne Bacteria Isolated from Retail Veal in the United States. *J. Food Prot.* **2021**, *84*, 1749–1759. [CrossRef]
83. Matamoros, S.; van Hattem, J.M.; Arcilla, M.S.; Willemse, N.; Melles, D.C.; Penders, J.; Vinh, T.N.; Thi Hoa, N.; Bootsma, M.C.J.; van Genderen, P.J.; et al. Global Phylogenetic Analysis of *Escherichia Coli* and Plasmids Carrying the Mcr-1 Gene Indicates Bacterial Diversity but Plasmid Restriction. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15364. [CrossRef] [PubMed]
84. Luo, Q.; Wang, Y.; Xiao, Y. Prevalence and Transmission of Mobilized Colistin Resistance (Mcr) Gene in Bacteria Common to Animals and Humans. *Biosaf. Health* **2020**, *2*, 71–78. [CrossRef]
85. Raz, R. Fosfomicin: An Old—New Antibiotic. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 4–7. [CrossRef] [PubMed]
86. Liu, Q.; Chen, W.; Elbediwi, M.; Pan, H.; Wang, L.; Zhou, C.; Zhao, B.; Xu, X.; Li, D.; Yan, X.; et al. Characterisation of *Salmonella* Resistome and Plasmidome in Pork Production System in Jiangsu, China. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 617. [CrossRef]
87. Güneri, C.Ö.; Stingl, K.; Grobbel, M.; Hammerl, J.A.; Kürekcü, C. Different FosA Genes Were Found on Mobile Genetic Elements in *Escherichia Coli* from Wastewaters of Hospitals and Municipals in Turkey. *Sci. Total Environ.* **2022**, *824*, 153928. [CrossRef]
88. Wong, V.K.; Baker, S.; Pickard, D.J.; Parkhill, J.; Page, A.J.; Feasey, N.A.; Kingsley, R.A.; Thomson, N.R.; Keane, J.A.; Weill, F.X.; et al. Phylogeographical Analysis of the Dominant Multidrug-Resistant H58 Clade of *Salmonella* Typhi Identifies Inter- and Intracontinental Transmission Events. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 632–639. [CrossRef]
89. Chen, W.; Fang, T.; Zhou, X.; Zhang, D.; Shi, X.; Shi, C. IncHI2 Plasmids Are Predominant in Antibiotic-Resistant *Salmonella* Isolates. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1566. [CrossRef]
90. Li, L.; Liao, X.; Yang, Y.; Sun, J.; Li, L.; Liu, B.; Yang, S.; Ma, J.; Li, X.; Zhang, Q.; et al. Spread of OqxAB in *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Predominantly by IncHI2 Plasmids. *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68*, 2263–2268. [CrossRef]
91. Ministerio de Salud (Minsa). Plan Nacional Para Enfrentar La Resistencia a Los Antimicrobianos 2017–2021. Perú. 2017. Available online: <https://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Acceso/URM/GestionURMTrabSalud/ReunionTecnica/VIII/Dia2/Antimicrobianos/PlanNacionalATM-2017-2021.pdf> (accessed on 1 June 2022).
92. Ashley, R.E.; Dittmore, A.; McPherson, S.A.; Turnbough, C.L.; Neuman, K.C.; Osheroff, N. Activities of Gyrase and Topoisomerase IV on Positively Supercoiled DNA. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 9611–9624. [CrossRef]
93. Shaheen, A.; Tariq, A.; Iqbal, M.; Mirza, O.; Haque, A.; Walz, T.; Rahman, M. Mutational Diversity in the Quinolone Resistance-Determining Regions of Type-II Topoisomerases of *Salmonella* Serovars. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1455. [CrossRef]
94. Li, X.Z.; Plésiat, P.; Nikaido, H. The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28*, 337–418. [CrossRef] [PubMed]
95. Rahmati, S.; Yang, S.; Davidson, A.L.; Zechiedrich, E.L. Control of the AcrAB Multidrug Efflux Pump by Quorum-Sensing Regulator SdiA. *Mol. Microbiol.* **2002**, *43*, 677–685. [CrossRef] [PubMed]

96. Martínez-Puchol, S.; Pons, M.J.; Ruiz-Roldán, L.; Laureano-Adame, L.; Corujo, A.; Ochoa, T.J.; Ruiz, J. Nitrofurantoin Resistance in *Salmonella enterica* Isolated from Meat for Human Consumption. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* **2020**, *37*, 99–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Miryala, S.K.; Ramaiah, S. Exploring the Multi-Drug Resistance in Escherichia Coli O157:H7 by Gene Interaction Network: A Systems Biology Approach. *Genomics* **2019**, *111*, 958–965. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Zhang, Y.E.; Bærentsen, R.L.; Fuhrer, T.; Sauer, U.; Gerdes, K.; Brodersen, D.E. (P)PpGpp Regulates a Bacterial Nucleosidase by an Allosteric Two-Domain Switch. *Mol. Cell* **2019**, *74*, 1239–1249.e4. [[CrossRef](#)]
99. Lin, S.; Hanson, R.E.; Cronan, J.E. Biotin Synthesis Begins by Hijacking the Fatty Acid Synthetic Pathway. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 682–688. [[CrossRef](#)]
100. Al-Dabbagh, B.; Mengin-Lecreulx, D.; Bouhss, A. Purification and Characterization of the Bacterial UDP-GlcNAc:Undecaprenyl-Phosphate GlcNAc-1-Phosphate Transferase WecA. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 7141–7146. [[CrossRef](#)]

5.2 CAPÍTULO II- ARTIGO INTITULADO “ THE GENOMIC APPROACH OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF SALMONELLA TYPHIMURIUM ISOLATES FROM GUINEA PIGS, LIMA, PERU”.

Este artigo foi publicado no periódico *Research in Microbiology* (Fator de impacto: 3.99) em Dezembro de 2022.

A *Salmonella* Typhimurium está entre os patógenos causadores de doenças por transmissão alimentar e salmonelose nos porquinhos da Índia. A criação do porquinho-da-Índia tem importância nutricional e econômica na região andina, porém apresentam um inadequado sistema de produção e os casos de Salmonelose causam uma alta taxa de mortalidade dos mesmos. O porquinho-da-Índia de criação atua como um potencial reservatório e transmissor de linhagens multidroga resistentes que ameaçam os tratamentos com antibióticos e a saúde pública. Neste estudo, nós realizamos uma análise de enfoque genômico para elucidar a diversidade e resistência antimicrobiana nos isolados procedentes de porquinhos da Índia de criação e alimentos. A metodologia consistiu na (1) montagem e tipificação das seis linhagens isoladas de porquinho-da-Índia de criação, (2) análise da diversidade nucleotídica e genes, filogenia e estruturação populacional entre isolados de porquinho-da-Índia de criação e alimentos, (3) caracterização e mapeamento dos elementos transponíveis (plasmídeos, ilhas genômicas, fagos, sequências de inserção) associados com a resistência antimicrobiana (AMR) e virulência no genoma, (4) caracterização de genes e mutações associadas à resistência antimicrobiana, e (5) avaliação da relação filogenética e diversidade dos plasmídeos. Os resultados obtidos demonstraram que as 26 linhagens pertenceram à sequência tipo ST19, classificadas em sua maioria como sorovar Typhimurium, exceto para seis linhagens, denotadas como variante monofásica 4,[5],12:i:-. As linhagens peruanas pertencem pelo menos três filogrupos (HC50_9757, HC50_67422, HC100_9460) e apresentam resistência antimicrobiana e virulência intrínseca pelo conteúdo de 156 genes de virulência distribuídas em pelo menos 13 ilhas de patogenicidade, 28 genes AMR no cromossomo e um plasmídeo de virulência (IncFIB). Identificamos três plasmídeos transmissíveis de resistência, IncI-gamma-K1, IncI1-I(alpha), and Col(pHAD28), detectados previamente em casos clínicos e associados a genes AMR. Apresentamos unicamente três linhagens carregando plasmídeos resistentes à aminoglicosídeos (*strAB*, *AaadA1*), tetraciclina (*tetAB*), sulfatrimetopim (*drfA15*, *sulI*), ácido nalidixico (*qnrB4*); e 11 linhagens carregando a mutação no *gyrA* associados a moderada resistência a ácido nalidixico. Assim, duas linhagens carregam duas novas mutações não sinônimas que podem alterar a função das proteínas associadas à resistência à cefalosporina e fluoroquinolonas. Este estudo reporta

ainda linhagens carregando plasmídeos transmissíveis com uma reduzida resistência a antibióticos da primeira linha, uma moderada resistência ao ácido nalidíxico associado a mutações não sinônimas. Dessa forma, a estruturação e análise da diversidade e filogenia dos elementos móveis nos permitem conhecer o perfil de genes AMR, mecanismos de transmissão e evolução nas linhagens MDR.



Original Article

The genomic approach of antimicrobial resistance of *Salmonella* Typhimurium isolates from guinea pigs in Lima, Peru



Raquel Hurtado ^a, Debmalya Barh ^{a, b}, Luís Cláudio Lima de Jesus ^a,
 Marcus Vinicius Canário Viana ^a, Sandeep Tiwari ^{c, d}, Flávia Figueira Aburjaile ^e,
 Dennis E. Carhuaricra Huaman ^f, Bertram Brenig ^g, Lenin Maturrano Hernández ^f,
 Vasco Azevedo ^{a, *}

^a Laboratório de Genética Celular e Molecular, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil

^b Institute of Integrative Omics and Applied Biotechnology, Nonakuri, Purba Medinipur, West Bengal, 721172, India

^c Pós-graduação em Microbiologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

^d Programa de Pós-graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

^e Preventive Veterinary Medicine Department, Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^f SANIGEN, Laboratorio de Biología y Genética Molecular, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, San Borja, Lima, 15021, Peru

^g Institute of Veterinary Medicine, University of Göttingen, Burckhardtweg 2, Göttingen, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 December 2022

Accepted 27 May 2023

Available online 10 June 2023

Keywords:

Salmonellosis

Foodborne disease

Antimicrobial resistance

Whole-genome sequencing

Genetic mobile elements

SNPs

ABSTRACT

Salmonella Typhimurium is an important agent of foodborne diseases. In Peru, the emergence of multidrug-resistant isolates of *S. Typhimurium* from the food chain could be linked to guinea pig farming as a potential reservoir and their uncontrolled antibiotic treatment against salmonellosis. In this study, we performed the sequencing, genomic diversity, and characterization of resistance elements transmitted by isolates from farm and meat guinea pigs. The genomic diversity and antimicrobial resistance of *S. Typhimurium* isolates were performed using nucleotide similarity, cgMLST, serotyping, phylogenomic analyses, and characterization of resistance plasmids. We found at least four populations of isolates from farm guinea pigs and four populations from meat guinea pigs without finding isolated transmission between both resources. Genotypic resistance to antibiotics was observed in at least 50% of the isolates. Among the farm guinea pig isolates, ten were found to be resistant to nalidixic acid, and two isolates exhibited multidrug resistance to aminoglycosides, tetracycline-fluoroquinolone (carrying *strA-strB-tetA-tetB* genes and *gyrA* S83F mutation), or trimethoprim-sulfonamide (carrying *AaadA1-drfA15-sul1* genes). Additionally, two isolates from the meat source were resistant to fluoroquinolones (one of which had enrofloxacin resistance). The transmissible resistance plasmids with insertion sequences (IS) such as IncI-gamma-K1-ISE3-IS6, IncI1-I (alpha)-IS21-Tn10, and Col (pHAD28) were commonly found in isolates belonging to the HC100-9757 cluster from both guinea pigs and human hosts. Altogether, our work provides resistance determinants profiles and *Salmonella* sp. circulating lineages using WGS data that can promote better sanitary control and adequate antimicrobial prescription.

© 2023 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail addresses: raquelgen1@gmail.com (R. Hurtado), dr.barh@gmail.com (D. Barh), luislimma@gmail.com (L.C.L. de Jesus), canarioviana@gmail.com (M.V. Canário Viana), sandip_sbtbi@yahoo.com (S. Tiwari), faburjaile@gmail.com (F.F. Aburjaile), heraud04@gmail.com (D.E. Carhuaricra Huaman), bbrenig@gwdg.de (B. Brenig), amaturrano@unmsm.edu.pe (L.M. Hernández), vascoariston@gmail.com (V. Azevedo).

1. Introduction

Guinea pig (*Cavia porcellus*) is a rodent species traditionally consumed in the Andean region, with a high nutritional value and economic impact on the countries of this region. In a worldwide context, Peru has the central production system of guinea pigs for human consumption. This system is predominantly familiar-commercial with an increasingly intensive scale [1]. Guinea pig

production has some limitations due to management and sanitary conditions deficiencies, inducing salmonellosis cases, a frequent disease associated mainly with the bacteria *S. Typhimurium* [1,2]. Furthermore, this infection affects guinea pigs' different systems (e.g., respiratory, digestive, nervous, and reproductive), which leads to a high morbidity and mortality rate [1] and turns this host into *Salmonella*'s transmission vector in the human food chain [3,4].

Salmonella Typhimurium is one the most important pathogens causing foodborne disease and salmonellosis in animal husbandry worldwide [5]. In Peru, the National Center of Epidemiology, Prevention, and Disease Control critically reported 1,754,586 diarrheal cases between 2018 and 2019 and 495 foodborne outbreaks between 2010 and 2021 [6,7]. *Salmonella* is the major contributor to the outbreak associated with 31 of them, with chicken and pork meat being the main food vehicle of transmission [7]. In the last year, the monitoring of guinea pigs with salmonellosis showed an incidence of 26% [1,8,9]. Few cases of Salmonellosis in humans are related to guinea pigs, being that seven cases were associated with consumed guinea pigs' meat between 2006 and 2009 in the USA [8].

The World Health Organization (WHO) lists *Salmonella* as a priority pathogen because of increasing multidrug resistance (MDR) cases, mainly to current treatment antibiotics (third-generation cephalosporin and fluoroquinolone). For animal husbandry, including guinea pigs, there is prophylactic consumption and indiscriminate use of antibiotics to treat salmonellosis [1], which is associated with the emergence of MDR strains and implies a risk to public health.

Mobile genetic elements (MGE) such as plasmids can rapidly disseminate antimicrobial resistance (AMR) traits through bacterial populations. Reconstruction and typing plasmids may provide insights into the spreading dynamics from livestock to humans [10]. Traditional epidemiological strategies such as microbiological, serological, and molecular analyses allowed the detection of scarce MDR lineages [11]. However, WGS-based specific strategies such as cgMLST, SNPs, pan-genome, phylogenomic, and GWAS would allow for the differentiation of closely related strains, detect outbreaks, predict antimicrobial susceptibility, and discover new AMR mechanisms [12,13].

Despite the emergence of foodborne outbreaks involving *Salmonella* and the increased antimicrobial resistance, there is no genomic tracking of the pathogen and antimicrobial resistance's risk transmission in guinea pigs' production. Currently, molecular and phenotypic strategies of *S. Typhimurium* isolates from guinea pigs farm found high resistance to first-line treatment antibiotics (chloramphenicol, tetracycline, sulfamethoxazole, nitrofurantoin, enrofloxacin, and quinolones) [3,14]. Meanwhile, farm surveillance worked with fewer representative source samples and traditional strategies (PCR, antibiogram) with a unique study at the genomic level. In this context, this study sequenced six novel genomes from guinea pig farms and added 20 genomes from food and farm guinea pigs to monitor and understand the genetic factors associated with antimicrobial resistance and transmission among *S. Typhimurium* isolates from guinea pigs.

2. Material and methods

2.1. Bacterial isolates

Six *S. Typhimurium* isolates were collected from guinea pigs with salmonellosis in two farms, as part of project "Caracterización del sistema fecal en animales de producción como amenaza potencial a la salud pública en Lima Metropolitana" in Lima, Peru. The isolates were processed at the Laboratory of Biology and Molecular Genetics, Faculty of Veterinary Medicine, Universidad Nacional

Mayor de San Marcos. Organ fragments were aseptically transferred to peptone water and incubated at 37 °C for 18 h. Afterward, the enriched cultures were transferred to Rappaport Vassiliadis Soya (RSV) broth and incubated at 42 °C for 24 h. Then, an aliquot was streaked in XLD (Xylose Lysine Deoxycholate) agar broth and incubated at 37 °C for 24 h. The *S. Typhimurium* colonies were confirmed by PCR reaction, according to Jamshidi [15]. The strains' details are described in Table 1.

2.2. Whole genome sequencing, assembly, annotation, and typing

Genomic DNA extractions were performed using PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA). DNA concentration was measured using Qubit dsDNA HS assay (Invitrogen). The genome sequence was performed on the Hiseq 2500 platform (Illumina, San Diego, CA, USA), and paired-end libraries (2 × 150 bp) were prepared using the Truseq3 library. The raw sequences were checked using FastQC v0.11.8 [16], and the trimming of low-quality reads was performed through Trimmomatic v.0.39 [17].

For all isolates' sequences, a *de novo* assembly was performed using Unicycler v0.4.5 [18]. A hybrid assembly strategy was performed for the strain SE7, as follows. The SE7's scaffolds construction was performed using ContiguatorF [19] GenomeFinisher v1.4 (<http://gfinisher.sourceforge.net/index.php>). Strain SE7 was used as a Peruvian reference genome for subsequent analysis. The six genomes were submitted under the BioProject: PRJNA896238. For the subsequent analyses, the annotation was performed using PROKKA v1.11 [20]. Serovar identification was evaluated using SeqSero [21] and sequence type (ST) classification using MLST (<https://github.com/tseemann/mlst>).

2.3. Addition of 20 *Salmonella Typhimurium* genomes from food and farm guinea pigs

We added 10 *Salmonella Typhimurium* genome sequences isolated from two farm guinea pigs with salmonellosis from Lima, Peru, under BioProject PRJNA847586 obtained from NCBI. Other ten *Salmonella Typhimurium* were obtained as paired raw sequences isolated from guinea pigs' meat from Ecuador and Peru obtained from European Nucleotide Archive Database and included in the following analysis (Table S1). For the last 10 samples, the assembly, annotation, and typing were done following the method described in session 2.2.

2.4. Diversity analysis

All the orthologous genes across the 26 *S. Typhimurium* genomes were predicted using Roary v3.12 [21] with default parameters. The principal component analysis (PCA) was performed using the base R' `prcomp()` function to carry out the clustering of the strains by the accessory gene content. The phylogenetic tree was constructed based on the core genome using RAxML v8.2.12 [23] with maximum likelihood method, GTR + Gamma model, 1000 bootstrap replicates and visualized using the `ggtree` package in R (R Development Core Team, 2016). The core SNPs were obtained from the variant calling for all the isolates against the reference SE7 strain using `snippy` (<https://github.com/tseemann/snippy>). The nucleotide diversity between genomes was calculated using the pairwise SNP distances from the core-genome alignment using `SNP-dists` v0.6 (<https://github.com/tseemann/snp-dists>). We performed hierarchical clustering (HC) approaches of core genome MLST (cgMLST) using the Enterobase [24].

Table 1
Epidemiological data, sequencing, genomic structure, and typing analyses from six *Salmonella* Typhimurium isolates from Peruvian Guinea Pigs.

Strain	Country	Source	Year	Accession number	Cov	Mb	# Contigs	# Proteins	# of Plasmids	Serovar typing	ST	H100
SE2	Peru	Farm	2016	JAPDVP000000000	55.26x	4811853	74	4490	2	Typhimurium	19	9757
SE3	Peru	Farm	2016	JAPDVO000000000	53.59x	4884534	72	4591	1	Typhimurium	19	9757
SE4	Peru	Farm	2016	JAPDVN000000000	55.15x	5014965	75	4741	2	Typhimurium	19	9757
SE5	Peru	Farm	2016	JAPDVM000000000	54.33x	4949980	76	4662	2	Typhimurium	19	9757
SE6	Peru	Farm	2016	JAPDVL000000000	55.03x	4841031	73	4541	2	4,[5],12:i:-	19	9460
SE7	Peru	Farm	2016	SUB12234903 (Biosample)	54.19x	4966101	2	4529	1	4,[5],12:i:-	19	9460

2.5. Prediction and characterization of mobilome in reference genomes

From the genomes we assembled, the plasmid contigs were separated from chromosomal contigs using MOB-suite [25]. The plasmids were annotated and classified by family and mobility using MOB-suite and oriTFinder [26]. Thus, we chose to circularize one reference sequence plasmid per family. Plasmid scaffolds' gaps were manually closed using consensus sequences generated by mapping reads against the reference plasmids (CP081672.1, CP016585.1, NZ_MK070495, NC_003277.2) using CLC Genomics Workbench v7.0 (Qiagen, USA). We evaluated nucleotide variant and phylogeny for each family plasmid following the steps and parameters described in method session 2.4.

Furthermore, prophages and genomic islands (GIs) were predicted from chromosomal reference SE7 using PHASTER (<https://phaster.ca/>) and islandViewer (<https://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/>), respectively. Insertion sequences (ISs) were predicted from reference chromosomes and plasmids using ISEScan [27]. Subsequently, the MGEs were mapped and compared at the nucleotide identity level against the other 25 strains using BRIG [28].

2.6. Identification of virulence and antimicrobial resistance genes

Antimicrobial resistance genes (ARGs) were predicted from chromosomes and plasmids of all strains using Abricate (<https://github.com/tseemann/abricate>) and CARD [29] database. The virulence genes prediction was performed using the VFDB database [30]. Minimum coverage and identity of 85% were used to identify those genes.

Chromosomal point mutations associated with AMR were predicted using PoinFinder [31]. The ARGs were classified according to resistance mechanisms and drug class using the CARD database and manual curation [29]. The ARGs and virulence genes were mapped on reference chromosomes and plasmids using BRIG to exhibit the architecture and repertoire genes of each MGEs.

2.7. Effect of new single nucleotide variations in antibiotic resistance proteins

ARGs sequences were extracted using Roary [22], followed by sequence alignment with MAFFT v7.307 [32] to identify single nucleotide variations (SNVs) in chromosomal ARGs. Then, SNP-sites [33] was used for the variants calling from gene alignments. Structure modeling of ARGs was performed and validated using the Swiss Model homology server and Ramachandran plot. The 3D structure was used to predict the stability of protein with an altered amino acid using the Dynamute2 tool [34].

3. Results

3.1. Diversity and phylogeny of *S. Typhimurium* isolate obtained from guinea pigs

The six *S. Typhimurium* isolates from Peruvian guinea pigs had a genome size between 4.81 and 5.01 Mb, with an average of 4607 proteins and one or two plasmids. The assembly quality has a mean depth coverage of >53.59x. MLST typing classified all strains belonging to ST19 (Table 1). For the following comparative analyses, we added 20 genome isolates from guinea pigs' farms and meat (Table S1).

We worked at the hierarchical clustering levels 100 (HC100) and 50 (HC50) to observe differences between phylogroups. The HC100 level comprised three clusters: HC100_9757 ($n = 14$) contains farm and meat samples from Peru and Ecuador. HC100_41507 contains meat samples from Ecuador ($n = 6$). HC100_9460 contains Peruvian samples from the farm ($n = 4$) and two samples from Ecuador and meat. The HC50 level comprised seven distinct sub-clusters or populations, and Peruvian isolates belong to the largest sub-clusters H50_67422, H50_9757, and HC50_109907 following HC50_61863 and Equatorial isolates belong to the largest cluster/sub-cluster HC100_41507/HC50_41507 following sub-cluster HC50_21802 and HC50_6907 (Fig. 1). Previously, the Peruvian HC100_9757 and HC100_9460 clusters were identified within the phylogenetic alpha clade to *S. Typhimurium* [35].

Genomic serotyping classified 19 isolates as serovar Typhimurium belonging to clusters HC100_9757 and HC100_41507. The other six isolates were classified as 4,[5],12:i:-, a monophasic serovar Typhimurium variant belonging to the HC100_9460 cluster (Fig. 1). The un-rooted phylogenetic tree is based on a core genome containing five sub-clades; the three most differentiated sub-clades correspond to three different HC100 clusters (Fig. 1). Some sub-clades harbor isolates with the same country or source origin, but they do not allow total discrimination. Four isolates from meat sources are most closely related to the two clusters from farm sources, FDA00011664 and FDA00000688 isolates belong to HC100_9757; FDA00011660 and FDA00000345 strains belong to HC100_9460 cluster (Fig. 1); however, the strains belong to different sub-clusters or populations.

The pan-genome analysis examined gene content diversity, and the core genome was used as input data to analyze the phylogeny. The pangenome has 5357 orthologous genes, 4205 core genes, and 1152 accessory genes. Core and accessory genomes constitute 78.49% and 21.50% of the repertoire genome, respectively. The accessory heatmap and PCA analysis with 49.52% of the gene repertoire distinguished the gene content in at least four groups, corresponding to HC50_9757, HC50_67422, HC100_41507, HC100_9460 (Fig. S1). The isolates from cluster HC100_41507 had fewer accessory genes from food samples compared to the

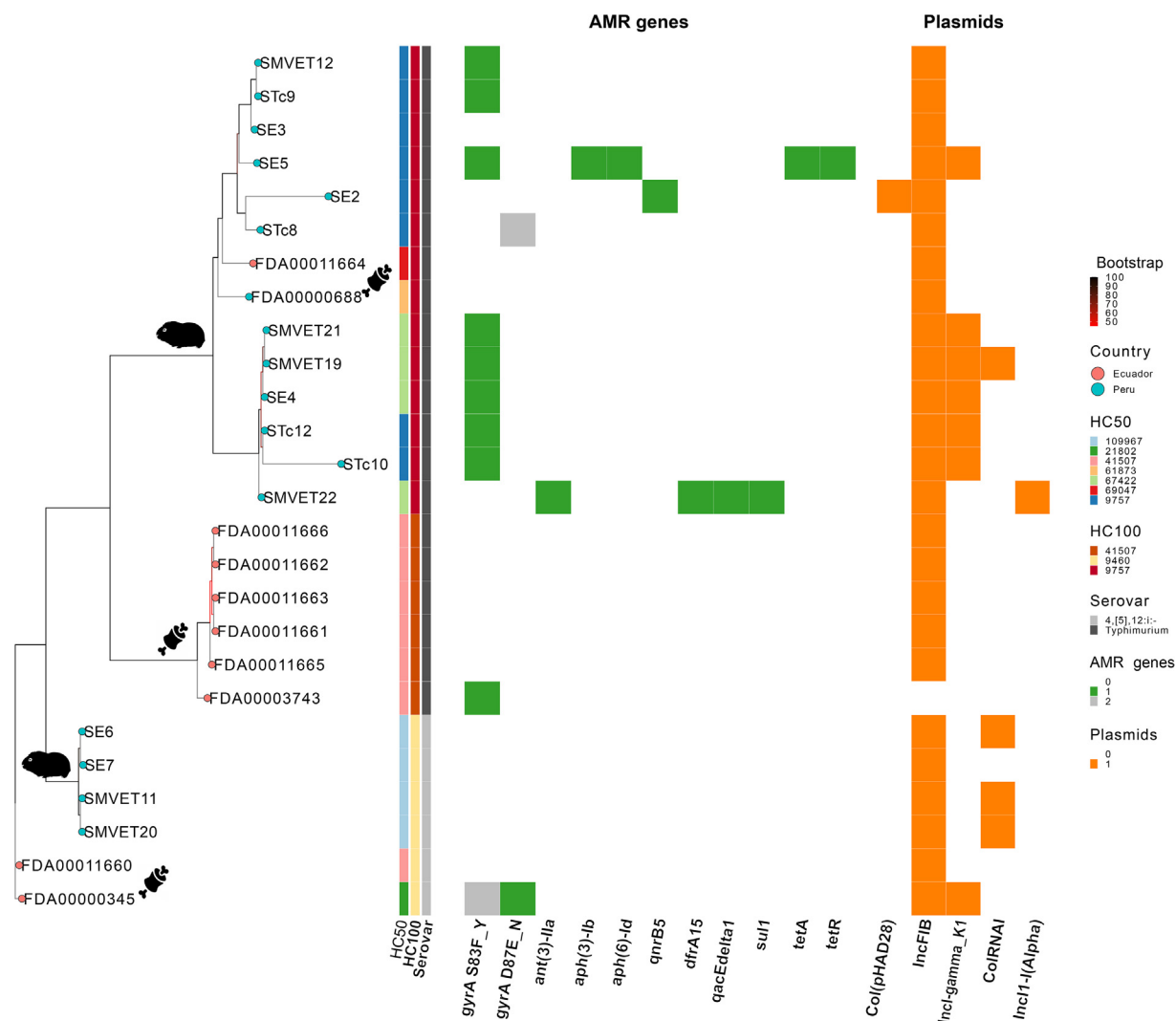


Fig. 1. The phylogenetic tree was generated using the ML method, 1000 replicates, and the GTR + GAMMA model to estimate the evolutionary divergence between 26 *S. Typhimurium* isolates from the farm guinea pigs and guinea pigs' meat. The heatmap shows the presence and absence of antimicrobial resistance chromosomal mutation and genes and plasmids for each isolate. Country, serovar, sources, and HC cluster were shown in the heatmap. HC100_9460 cluster strains were classified as serovar 4,[5],12:i:-. The HC100_9757 (FDA00011664 and FDA0000688) and HC100_9460 (FDA00011660 and FDA0000345) cluster strains from meat sources were the most closely related to isolates from farm sources. FDA00011664, FDA0000688, FDA00011660, and FDA0000345 isolates from meat sources belong to the major HC100_9757 and HC100_9460 clusters but distinct sub-cluster or populations from farm sources.

H50_67422 sub-cluster and STc12 and STc10 strains (HC100_9757 cluster). The closest and largest sub-cluster and cluster distances were HC50_674222 (2–14 SNPs differences) and HC50_9757 (3–92 SNPs) from the HC100_9757 cluster; HC50_109907 (4–14 SNPs) from HC100_9460 cluster and HC100_41507 (1–53 SNPs) (Fig. S2).

3.2. Nucleotide similarity and mobile genetic elements shared between *Salmonella Typhimurium* strain SE7 and the others

Mobile genetic elements in SE7 chromosome were characterized by virulence, resistance, and phage content and compared with the chromosomes from the other 25 strains (Fig. 2). The comparison allowed us to identify shared and unique MGEs to distinct resistance and virulence regions and their possible transmission mechanism.

All strains share 18 genomic islands (GIs) and 156 virulence genes, which evidence the conservation of these MGEs and virulence in *S. Typhimurium* isolates. The 13 *Salmonella* pathogenicity islands (SPIs) and three phages carrying virulence genes were

characterized (Fig. 2). Among these, there are islands containing operons involved with membrane-associated type III secretion system (T3SS) (SPI1), intracellular survival (SPI2), intraphagosomal survival and adhesion (SPI3), membrane ruffling and invasion (SPI5), T4SS secretion systems (SPI6), virulence and adhesion (SPI9), and cytoskeleton rearrangement (SPI12). Also, three SPIs contained the operons fimbriae/pili *fimAICDHFZYW*, *csgABCDEF*, and *lpfABCDE* (Table S3, Table S4).

We found seven prophages in all strains, including intact (Gifsy2, Gifsy1), questionable (Fels-1, Cronob_ESSI/ΦSE7-6), and incomplete (Cronob_vB/ΦSE7-1, Escher_500465/ΦSE7-4, Burkho_phiE255/ΦSE7-7) prophages (Fig. 2). The description of the prophages can be found in Table S4. Nucleotide similarity shows that the virulence prophage Cronob_ESSI is absent in the isolates from the HC100_9757 cluster. In addition, the adherence gene *shdA* was only present in strains SE3, STc10, and FDA00003743 (Table S3). Also, we identified twenty-seven ISs belonging to families IS3, ISNCY, IS200/IS605, IS21, IS66, IS256, IS630, IS5, and newIS contained mostly in prophages and GEIs (Fig. 2).

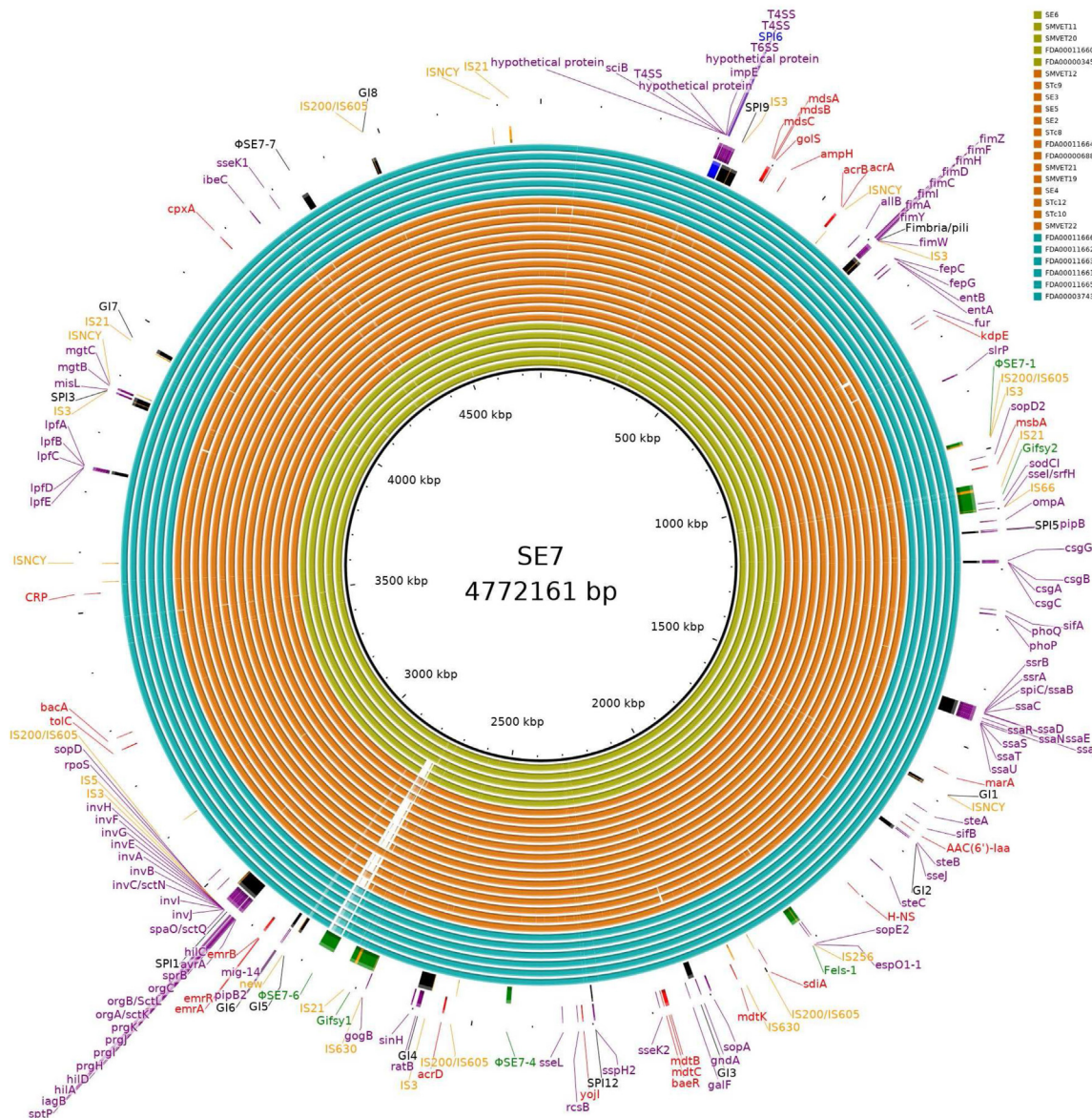


Fig. 2. Circular map and genome comparison of 26 *S. Typhimurium* isolates using SE7 as reference chromosome. The outer arch represents the location of 18 genomic islands (black), 7 prophages (green), 27 insertion elements (orange), 27 ARGs (red), and 156 virulence genes (purple). The first ring shows the coordinates and total genome size of the SE7 reference sequence, and the following rings 2 to 25 represent the comparison identity by intensity color against the other genomes. The colors of these rings represent the clusters HC100_9460 (green), HC100_9757 (orange), and HC100_41507 (blue). Exceptionally, nucleotide similarity shows the prophage region Cronob_ESS1 not shared by all strains.

We characterized all the virulence and resistance plasmids and compared them to one plasmid reference for each plasmid family. Thus, we mapped the genes of interest on the reference plasmids p1-IncFIB-SE7, p2-ColRNAI-SE6, p2-Incl-gamma-K1-SE5, p2-Incl1-(alpha)-SMVET22, and p2-Col (pHAD28)-SE2. All the plasmids were mobilizable or conjugative; the three last plasmid families were present in isolates SE5, SMVET22, and SE2 belonging to the HC100-9757 cluster and carrying ARGs. All strains except FDA00003743 had a virulence plasmid belonging to the IncFIB family (Fig. S3), a prevalent plasmid found in the serovar Typhimurium. This plasmid shows a conservative region harboring *pefABCD*, *spvBCD* operon, *mig-5*, and *rck* genes associated with virulence without carrying resistance genes. This plasmid also harbored the type IV pilus genes involved in their conjugative transference. In addition, 43 SNPs were found between the 25 IncFIB plasmids, which include 21 missense variants, 11 synonymous variants, two-stop gains, and

non-coding. There are between 1 and 18 SNPs differences between HC100 intra-cluster plasmids (Fig. S4). Phylogenetic tree and nucleotide diversity based on 25 IncFIB plasmids show similar tree topology and divergence based on the core genome (Fig. S5).

3.3. Genotype profile of AMR acquired genes in plasmids and point chromosomal mutation

The antimicrobial resistance genotypic profile of the 26 isolates shows the presence and drug classification of 36 different ARGs, of which 28 were chromosomal, and eight were acquired genes (Table S2). Chromosomal ARGs were associated with resistance to aminoglycoside and/or aminocoumarin (AAC(6')-Iaa, *acrD*, *kdpE*, *mdtB*, *mdtC*, *baeR*, *cpxA*), fluoroquinolone (*emrABR*, *mdtK*, *gyrA*), and nitroimidazole (*msbA*). Others were beta-lactamase (*ompH*, *ompA*) and multiclass (*acrB*, *golS*, *marA*, *mdsA*, *mdsB*, *mdsC*, *CRP*, *acrA*, *acrE*,

presented commonly colRNAi, and in the case of HC100_41507 cluster strains did not present resistance plasmids.

Condition environmental and/or mutation could influence changes in the expression of chromosomal ARGs. As a result, we detected four different chromosomal mutations in the *gyrA* gene associated with fluoroquinolone resistance in 11 isolates. Nine isolates belong to the cluster HC100_9757 ($n = 8$) and HC100_41507 ($n = 1$) and present the most common mutation at codon 83 in the *gyrA* gene (S83F). Also, we detect the FDA00000345 (HC100_9460) strain carrying two mutations in *gyrA* p.S83Y and p.D87E associated with resistance ciprofloxacin/enrofloxacin; and STc8 (HC100_9757) isolate harbor mutation in *gyrA* p.D87N (Fig. 1).

Ten novel nonsynonymous SNVs were predicted in six AMR chromosomal genes (Table S5). In one isolate, two novel mutations were found in *acrE2* (G299D) and *acrF* (G929D); both genes were related to cephalosporin, carbapenem, and fluoroquinolone resistance. Also, novel mutations were found in *mtdB*, *mdtC*, *mdtK*, *aac(6'')-Iaa* contented by HC100 cluster lineages (Table S5).

3.4. Prediction of the effects of novel SNVs in antimicrobial resistance core genes

We evaluated the effect of the ten novel SNVs found on chromosomal ARGs based on their location within protein domains and alteration of protein thermodynamic stability. We focus on the nonsynonymous SNVs that could significantly alter the folding free energy, decrease the stability and affect the function of the native protein. First, we confirmed that five SNVs were found in domains of AcrE, AcrF, MdtC, and MdtK proteins (Table S5). However, we considered only two SNVs in the *acrE* and *acrF* genes due to their presence within the protein domain and causing destabilizing effects.

4. Discussion

The emergence of multidrug-resistant *S. Typhimurium* is a threat to treatments of salmonellosis in guinea pigs' husbandry, and these hosts are potential zoonotic reservoirs. Our study performed genomic surveillance to monitor lineages and antimicrobial resistance determinants circulating in isolates from guinea pig production.

4.1. Three major Peruvian populations associated with isolates from farm sources

S. Typhimurium isolates were classified as sequence type 19, the most frequent ST belonging to the serovar *Typhimurium* in clinical cases [12] and farm guinea pigs [35] in Peru. We reported range differences of 174–740 SNPs between the Peruvian HC100 cluster. A minor range of SNPs differences was reported in ten isolates of guinea pigs farm isolates included in our study [35]. Pan-genome analysis of large *S. Typhimurium* datasets from clinical and diverse host isolates showed a higher number of orthologous genes ($n = 7,462, 8,849, 6988$) and fewer core genes ($n = 3,181, 3,862, 4186$) [12,36,37] compared to gene variability of 26 guinea pigs' isolates.

Serotyping classified six isolates from meat and farm origin as the monophasic variant *Typhimurium*. It is associated with the absence or deletion of the flagellin genes (*fljA* and *fljB*) [38]. Isolates of *Salmonella Typhimurium* variant 4,[5],12:i:- were a successful global pathogen associated with foodborne outbreaks and linked to MGEs accumulation without impairment of bacterial fitness [39]. Isolates of this variant belong to the HC100_9460 cluster, with fewer ARGs and MGEs diversity with the presence of Cronob_ESS12 virulent phage.

This study reported three main clade-cluster/sub-cluster (H50_67422, H50_9757, and HC100_9460/HC50_109967) with

nucleotides and gene differentiation circulating in isolates from farm guinea pigs in Peru. These populations belong to the most genetically diverse α clade with isolates related to epidemics and transmission of AMR [37]. Previously, molecular and phenotypic studies identified resistant *S. Typhimurium* isolates belonging to at least a unique or seven populations circulating in farms guinea pigs in Lima [3,14]. Current population structure and HierCC-cgMLST analyses of primarily clinical samples identified ten lineages [12] and two HC100 clusters from farm guinea pigs samples in Peru [35].

The effective vector transmission of *Salmonella* to humans is recurrently reported between foods from intensive farming (poultry, pigs, cattle) and humans' outbreak [5]. The foodborne illness outbreaks were typically associated with dominant multi-drug clones like DT104, ST34, and ST313 linked to MGEs carrying ARGs [40,41]. Although four samples from the food source belong to the largest clades (HC100_9757 and HC100_9460), they belong to other sub-cluster or populations, so we still cannot define the transmission route for breeding and meat consumption of guinea pigs, which requires large and representative data.

4.2. Resistance and virulence in *Salmonella Typhimurium* isolated from guinea pigs

Thirteen SPIs are responsible for the invasion, survival, and establishment of systemic infection were predicted in all isolates and annotated according to Kombade and Kaur [42]. The 155 virulence genes were present in all isolates except the gene *sdhA*, present in only three strains. Previously, SPIs were not exclusively found in isolates causing salmonellosis in guinea pigs [35]. As a result, we did not find a differential content of genomic and pathogenic islands between isolates of guinea pigs with Salmonellosis.

Bacteriophages constitute a significant part of the accessory genome and allow distinct pathovariants and lineages within serovar *Typhimurium*. Of seven prophages reported Gifsy 1, Gifsy2, and Fels-1 are virulent and were involved in the intracellular survival of *S. Typhimurium* [35,37,43]. *Cronobacter sakazakii* phage ESS1-2 (Φ SE7-6) was detected mostly in HC100_9460 and HC100_41507 cluster strains, considered a virulent phage belonging to the family Myoviridae [44]. Unlike the high diversity *Salmonella* based on phages, this reduced number would be due to comparison based on a reference strain.

MGEs carrying ISs could mobilize and act in bacterial adaptation as resistance, virulence, and catabolism. Eight SPIs and virulent prophages were detected carrying the IS21, IS66, IS630, IS256, and frequently IS3. IS256 family members are known to modulate virulence in Gram-positive bacteria [45]. Insertion sequences IS21 and IS630 integrated into Gifsy1 could degrade or resuscitate prophages [43].

Likewise, we identified a large number ($n = 28$) of intrinsic ARGs in which environmental conditions would modulate their expression. Intriguingly, most ARGs encoded efflux pumps are associated with resistance to multiclass antibiotics following fluoroquinolone and beta-lactam resistance. The gene *ampH* was found in 50% of strains without domain mutations and was previously reported in Peruvian clinical strains [12]. *AmpH* is a penicillin-binding protein (PBP). Mutations in a PBP gene decrease protein affinity and low susceptibility for β -lactams in *S. Typhimurium* [46]. The conservative number of ARGs to NTS and *Typhimurium* strains so far shows their intrinsic resistance [47].

4.3. The presence of family plasmids and their SNPs and genes content could be a sign of resistance, origin source, and spread

The IncFIB virulence plasmid carrying the *spvBCD* and *pefABC* operons was shared by 96% of isolates from guinea pigs. This

conserved plasmid is present mainly in serovar Typhimurium, in guinea pigs, and in clinical samples in Peru [12,35]. Furthermore, we emphasize 43 SNPs between the 24 IncFIB plasmids, including 21 missense variants that could act over virulence genes. In this way, IncFIB plasmid sequences allowed phylogenetic and nucleotide diversity distinction.

Also, we reported a high nucleotide variability in the IncI-gamma-K1 plasmid with an SNPs rate of 2.68%; these variants were presented in 45 CDSs but not in ARGs. Thus, increased missense variants could alter the function and offer a fitness cost. Few studies have performed in-depth analyses; a large dataset of the plasmids of *Chlamydia trachomatis* strains reveals a high SNPs rate of 2.97% in CDSs. However, these events could not be supported functionally or associated with dominant clones; additional evaluation should be considered [48]. The p2-IncI-gamma-K1-SE5 resistance plasmid is phylogenetically distant and could be submitted to evolutionary pressure distinctively. Unpublished data of phylogenetic analysis of Inc1-I (alpha), Inc1-gamma-K1, and col (pHAD28) plasmids showed a closer relationship among resistant plasmids from guinea pigs and human hosts.

4.4. Reported a reduced resistance to first-line antibiotics mediated by plasmids and moderate nalidixic acid resistance by chromosomal mutations in *S. Typhimurium* isolates from guinea pigs in Peru

Between 2003 and 2007, Latin American countries reported 25 *Salmonella* outbreaks linked to animal-based foods and related to resistance to several antibiotics [4]. The consequent indiscriminate use of antibiotics as prophylactic and therapeutics in animal production, including guinea pigs, are a potential risk to antimicrobial resistance transmission and a threat to public health [49]. *Salmonella* isolates from farm guinea pigs show phenotypically high resistance to nitrofurantoin, erythromycin or sulfamethoxazole, enrofloxacin, and moderate resistance to amoxicillin, ciprofloxacin, and chloramphenicol [3,14]. We detected three transmissible family plasmids Inc1-I (alpha), Inc1-gamma-K1, col (pHAD28). In Peru, these plasmid families were previously reported in *S. Typhimurium* isolates from guinea pigs and human hosts [12,35].

Genotypically, we reported 11 (42.3%) *S. Typhimurium* associated with nalidixic acid resistance, one isolate resistant to ciprofloxacin/enrofloxacin, and two MDR strains to aminoglycoside, tetracycline, and nalidixic acid or trimethoprim-sulfamethoxazole and aminoglycoside. Thus, compared to livestock and clinical samples, we present a reduced resistance genotypic profile to the first-line antibiotic of *S. Typhimurium* isolates from guinea pig hosts.

We reported a reduced resistance to the first-line antibiotic and high resistance to ciprofloxacin compared to small datasets of *Salmonella* isolates from farm guinea pigs and moderate MDR (12%) in large datasets from clinical isolates in Peru [12]. In Latin America, the USA, and England, NTS and *S. Typhimurium* strains of large datasets from foods and clinical cases showed a significant number (24.3%–43.0%) of MDR strains, including resistance to nalidixic acid, tetracycline, ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol, and ciprofloxacin (in some cases) [5,50,51].

In the present work, we related three resistance transmissible elements that potentially would increase ARGs spread. We found the p2-Inc1-I (alpha)-SMVET22 linked to Tn21 carrying ARGs to aminoglycoside (*aadA1*) and trimethoprim-sulfamethoxazole (*dfrA*, *sul1*), already reported by Carhuarica [35]. Tn21 and Inc1 families are strongly mobilizing ARGs [52], such as spectrum-extended β -lactamases (ESBLs) linked to Inc1-I (alpha) carried in *S. Typhimurium* from clinical samples [9]. Interestingly, the p2-Inc1-gamma-

K1-SE5 conjugative plasmid linked to ISE3 carries ARGs against aminoglycoside (*strA*, *strB*) and tetracycline (*tetA* and *tetR*). The IncI-gamma-K1 plasmid harbored a wide range of ARGs, and ESBL genes [53] and was associated with chloramphenicol and trimethoprim [9], but did not carry ARGs in isolates from guinea pig [35].

Fluoroquinolone resistance was associated with mutations in *gyrA* S83Y, D87E, D87N, and *qnrB4* gene carried in the Col (pHAD28)-SE2 plasmid. Previously, like genotypic profile was associated with nalidixic acid and ciprofloxacin resistance in *S. Typhimurium* isolates [12,51,54]. Additionally, we reported two new SNVs in MDR efflux pumps related to cephalosporin and fluoroquinolone resistance. Previously, new SNVs in AMR chromosomal genes were reported to be associated with resistance in multidrug and fluoroquinolone [12].

The demand for guinea pigs is growing and becoming widespread, with a high protein and economic value for the Andean countries. Hence, it is one of few genomic surveillance of antimicrobial resistance in isolates of *S. Typhimurium* from guinea pigs in South America. Thus, this study elucidated resistance mechanisms, plasmids' evolution, and the structure of a critical foodborne pathogen. Nonetheless, we still could not define if isolates from meat and farm come from the same contamination source, which would require large and representative data pointing transmission route of *S. Typhimurium*. Furthermore, due to reduced genomic surveillance of foodborne pathogens in Peru, continuous monitoring of the most critical *Salmonella* serovar Infantis, Enteritidis, and Typhimurium from foodborne is needed to monitor outbreaks and potential reservoirs.

Funding

This research work was funded by PROCENCIA-CONCYTEC through its executing unit ProCiencia - Proyectos de Investigación Básica 2018-01, Contract number N° 127-2018- FONDECYT; and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001". LM and DC was supported by Vicerrectorado de Investigación y Postgrado at Universidad Nacional Mayor de San Marcos (VRIP-UNMSM, Perú) by "Proyectos de Investigación con financiamiento para Grupos de Investigación 2019 (Project Code: A19080281)"

Institutional review board statement

The animal study protocol was approved by the Committee of Animal Ethics and Welfare from the Faculty of Veterinary Medicine of the Universidad Nacional Mayor de San Marcos (protocol code 2016-005, 20-12-2016).

Informed consent statement

Not applicable.

Data sharing

Genome sequence data are available on the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Metadata for samples, including accession, were included in Table 1.

Author contributions

R.H., V.A. conceptualized and designed the study; D.E.C.H., L.M.H.: collected the isolates data; R.H. methodology design, analyzed the data, interpreted results, and wrote the manuscript; L.L, D.B., M.V.C.V., S.T, F.F.A. edited the manuscript; V.A., L.M.H., B.B.

acquired the funding, V.A. supervised and provided resources and infrastructure for all bioinformatics analyses. All authors read and approved this final manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2023.104086>.

References

- [1] Matsuura SA, Morales CS, Calle ES, Ara GM. Susceptibilidad a antibacterianos *in vitro* de *Salmonella enterica* aislada de cuyes de crianza familiar-comercial en la provincia de Carhuaz, Áncash. *Rev Investig Vet Perú* 2010;21:93–9.
- [2] Sánchez-Macías D, Barba-Maggi L, Morales-delaNuez A, Palmay-Paredes J. Guinea pig for meat production: a systematic review of factors affecting the production, carcass and meat quality. *Meat Sci* 2018;143:165–76. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.05.004>.
- [3] Huamán M, Pérez C, Rodríguez J, Killerby M, Lovón S, Chauca L. Genetic characterization and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium in Guinea pigs under intensive breeding. *Rev Investig Vet Perú* 2020;31. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V31I1.17542>.
- [4] Quesada A, Reginatto GA, Español AR, Colantonio LD, Burrone MS. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp isolated animal food for human consumption. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2016;33:32–44. <https://doi.org/10.17843/RPMESP.2016.331.1899>.
- [5] Wang X, Biswas S, Paudyal N, Pan H, Li X, Fang W, et al. Antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium* isolates recovered from the food chain through national antimicrobial resistance monitoring system between 1996 and 2016. *Front Microbiol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00985>.
- [6] MINSA. Boletín epidemiológico del Perú. *Boletín Epidemiol Perú* 2019;28(49): 1245–67. ISSN 2415-076 2. www.dge.gob.pe.
- [7] Wessels K, Rip D, Gouws P. *Salmonella* in chicken meat: consumption, outbreaks, characteristics, current control methods and the potential of bacteriophage use. *Foods* 2021;10(8):1742. <https://doi.org/10.3390/foods10081742>.
- [8] Fournier JB, Knox K, Harris M, Newstein M. Family outbreaks of nontyphoidal salmonellosis following a meal of Guinea pigs. *Case Rep Infect Dis* 2015;2015: 864640. <https://doi.org/10.1155/2015/864640>.
- [9] Moya AL. Prevalencia de Salmonelosis en Cuyes (*Cavia porcellus*) Procedentes de Granjas del Centro Poblado Huancaquito Alto–Virú–La Libertad. Universidad Privada Antenor Orrego: Prevalencia de salmonelosis en cuyes (*Cavia porcellus*) procedentes de granjas del centro poblado Huancaquito Alto -. Virú - La Libertad (upao.edu.pe). Trujillo, Peru: Universidad Privada Antenor Orrego–UPAO; 2019. <http://repositorio.upao.edu.pe/handle/20.500.12759/5577>.
- [10] Darphorn TS, Bel K, Koenders-van Sint Anneland BB, Brul S, Ter Kuile BH. Antibiotic resistance plasmid composition and architecture in *Escherichia coli* isolates from meat. *Sci Rep* 2021;11:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81683-w>. 111 2021.
- [11] Rampadarath S, Puchooa D, Bal S. Repetitive element palindromic PCR (rep-PCR) as a genetic tool to study interspecific diversity in Euphorbiaceae family. *Electron J Biotechnol* 2015;18:412–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.09.003>.
- [12] Hurtado R, Barh D, Weimer BC, Viana MVC, Profeta R, Sousa TJ, et al. WGS-based lineage and antimicrobial resistance pattern of *Salmonella typhimurium* isolated during 2000–2017 in Peru. *Antibiotics* 2022;11:1170. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091170>.
- [13] Pearce ME, Alikhan NF, Dallman TJ, Zhou Z, Grant K, Maiden MCJ. Comparative analysis of core genome MLST and SNP typing within a European *Salmonella* serovar Enteritidis outbreak. *Int J Food Microbiol* 2018;274:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.023>.
- [14] Guillermo SR, Rocío R, Ana CO, Iván RW, Raúl RA, Lenin MH. Antimicrobial resistance and genotyping of *Salmonella Typhimurium* strains isolated from Guinea pigs (*Cavia porcellus*) from intensive production farms of the city of Lima, Peru. *Rev Investig Vet Perú* 2018;29:319–27. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V29I1.14089>.
- [15] Jamshidi A, Kalidari Ga, Hedayati M. Isolation and identification of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella typhimurium* from the eggs of retail stores in Mashhad, Iran using conventional culture method and Multiplex pcr assay. *J Food Saf* 2010;30:558–68. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2010.00225.x>.
- [16] Andrews S. FASTQC A quality control Tool for high throughput sequence data. Babraham Inst; 2015. <https://github.com/s-andrews/FastQC>.
- [17] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014;30:2114–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- [18] Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>.
- [19] Galardini M, Biondi EG, Bazzicalupo M, Mengoni A. CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes. *Source Code Biol Med* 2011. <https://doi.org/10.1186/1751-0473-6-11>.
- [20] Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 2014;30:2068–9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
- [21] Zhang S, den Bakker HC, Li S, Chen J, Dinsmore BA, Lane C, et al. SeqSero2: rapid and improved *Salmonella* serotype determination using whole-genome sequencing data. *Appl Environ Microbiol* 2019;85. <https://doi.org/10.1128/AEM.01746-19>.
- [22] Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* 2015;31: 3691–3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>.
- [23] Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 2014;30:1312–3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.
- [24] Zhou Z, Alikhan N-F, Mohamed K, Fan Y, Achtman M. The EnteroBase user's guide, with case studies on *Salmonella* transmissions, *Yersinia pestis* phylogeny, and *Escherichia* core genomic diversity. *Genome Res* 2020;30:138–52. <https://doi.org/10.1101/gr.251678.119>.
- [25] Robertson J, Nash JHE. MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. *Microb Genom* 2018. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000206>.
- [26] Li X, Xie Y, Liu M, Tai C, Sun J, Deng Z, et al. oriTfinder: a web-based tool for the identification of origin of transfers in DNA sequences of bacterial mobile genetic elements. *Nucleic Acids Res* 2018;46:W229–34. <https://doi.org/10.1093/nar/gky352>.
- [27] Xie Z, Tang H. ISEScan: automated identification of insertion sequence elements in prokaryotic genomes. *Bioinforma Oxf Engl* 2017;33:3340–7. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx433>.
- [28] Alikhan N-F, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics* 2011;12:402. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-402>.
- [29] Jia B, Raphenya AR, Alcock B, Wagelchner N, Guo P, Tsang KK, et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 2017. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1004>.
- [30] Chen L, Yang J, Yu J, Yao Z, Sun L, Shen Y, et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res* 2004;33:D325–8. <https://doi.org/10.1093/nar/gki008>.
- [31] Zankari E, Allesøe R, Joensen KG, Cavaco LM, Lund O, Aarestrup FM. Point-Finder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:2764–8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx217>.
- [32] Katoh K, Kuma KI, Toh H, Miyata T. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res* 2005;33:511–8. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKI198>.
- [33] Page AJ, Taylor B, Delaney AJ, Soares J, Seemann T, Keane JA, et al. SNP-sites: rapid efficient extraction of SNPs from multi-FASTA alignments. *Microb Genom* 2016. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000056>.
- [34] Rodrigues CHM, Pires DEV, Ascher DB. DynaMut2: assessing changes in stability and flexibility upon single and multiple point missense mutations. *Protein Sci Publ Protein Soc* 2021;30:60. <https://doi.org/10.1002/PRO.3942>.
- [35] Carhuarica Huaman DE, Luna Espinoza LR, Rodríguez Cueva CL, Duran Gonzales CG, Rosadio Alcántara RH, Setubal JC, et al. Genomic characterization of *Salmonella typhimurium* isolated from Guinea pigs with salmonellosis in Lima, Peru. *Microorganisms* 2022;10:1726. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091726>.
- [36] Fu S, Hiley L, Octavia S, Tanaka MM, Sintchenko V, Lan R. Comparative genomics of Australian and international isolates of *Salmonella Typhimurium*: correlation of core genome evolution with CRISPR and prophage profiles. *Sci Rep* 2017;7:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06079-1>. 71 2017.
- [37] Id MB, Alikhan N-F, Tan Thilliez Id G, Kirkwood Id M, Wheelerid NE, Petrovska L, et al. Evolution of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Driven by Anthropogenic Selection and Niche Adaptation. 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008850>.
- [38] Sun H, Wan Y, Du P, Bai L. The epidemiology of monophasic *Salmonella typhimurium*. *Foodborne Pathog Dis* 2020;17:87–97. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2676>.
- [39] Ingle DJ, Ambrose RL, Baines SL, Duchene S, Gonçalves da Silva A, Lee DYJ, et al. Evolutionary dynamics of multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Australia. *Nat Commun* 2021;12:4786. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25073-w>.
- [40] Branchu P, Bawn M, Kingsley RA. Genome variation and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathovariants. *Infect Immun* 2018. <https://doi.org/10.1128/IAI.00079-18>.
- [41] Van Puyvelde S, Pickard D, Vandelannoote K, Heinz E, Barbé B, de Block T, et al. An African *Salmonella Typhimurium* ST313 sublineage with extensive drug-resistance and signatures of host adaptation. *Nat Commun* 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11844-z>.
- [42] Kombade S, Kaur N. Pathogenicity Island in *Salmonella*. 2021. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96443>.
- [43] Wahl A, Battesti A, Ansaldo M. Prophages in *Salmonella enterica*: a driving force in reshaping the genome and physiology of their bacterial host? *Mol Microbiol* 2019;111:303–16. <https://doi.org/10.1111/MMI.14167>.

- [44] Lee J-H, Bai J, Shin H, Kim Y, Park B, Heu S, et al. A novel bacteriophage targeting *Cronobacter sakazakii* is a potential biocontrol agent in foods. *Appl Environ Microbiol* 2015;82:192–201. <https://doi.org/10.1128/AEM.01827-15>.
- [45] Razavi M, Kristiansson E, Flach C-F, Larsson DGJ. The association between insertion sequences and antibiotic resistance genes. *mSphere* 2020;5. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00418-20>.
- [46] Sun S, Selmer M, Andersson DI. Resistance to β -lactam antibiotics conferred by point mutations in penicillin-binding proteins PBP3, PBP4 and PBP6 in *Salmonella enterica*. *PLoS ONE* 2014;9. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0097202>.
- [47] Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 2009;69:1555–623. <https://doi.org/10.2165/11317030-000000000-00000>.
- [48] Jones CA, Hadfield J, Thomson NR, Cleary DW, Marsh P, Clarke IN, et al. The nature and extent of plasmid variation in *Chlamydia trachomatis*. *Microorganisms* 2020;8:E373. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030373>.
- [49] Javier Cano W, Fernando Carcelén C, Miguel Ara G, Willian Quevedo G, Arnaldo Alvarado S, Ronald Jiménez A. Efecto de la suplementación con una mezcla probiótica sobre el comportamiento productivo de cuyes (*Cavia Porcellus*) durante la fase de crecimiento y acabado. *Rev investig vet Perú*. 2016;27(1): 51–8. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172016000100007&lng=es.
- [50] McMillan EA, Gupta SK, Williams LE, Jové T, Hiott LM, Woodley TA, et al. Antimicrobial resistance genes, cassettes, and plasmids present in *Salmonella enterica* associated with United States food animals. *Front Microbiol* 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00832>.
- [51] Neuert S, Nair S, Day MR, Doumith M, Ashton PM, Mellor KC, et al. Prediction of phenotypic antimicrobial resistance profiles from whole genome sequences of non-typhoidal *Salmonella enterica*. *Front Microbiol* 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00592>.
- [52] Irrgang A, Zhao G, Juraschek K, Kaesbohrer A, Hammerl JA. Characterization of *E. coli* isolates producing extended spectrum beta-lactamase SHV-variants from the food chain in Germany. *Microorganisms* 2021;9:1926. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091926>.
- [53] Zhang D, Zhao Y, Feng J, Hu L, Jiang X, Zhan Z, et al. Replicon-based typing of IncI-complex plasmids, and comparative genomics analysis of IncI γ /K1 plasmids. *Front Microbiol* 2019;10:48. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00048>.
- [54] Tate H, Li C, Nyirabahizi E, Tyson GH, Zhao S, Rice-Trujillo C, et al. A national antimicrobial resistance monitoring system survey of antimicrobial-resistant foodborne bacteria isolated from retail veal in the United States. *J Food Protect* 2021;84:1749–59. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-005>.

6 DISCUSSÕES GERAIS

6.1 CAPÍTULO I

Recebemos a sequência de reads de 108 isolados de *S. Typhimurium*, 90 delas apresentaram uma média de cobertura de profundidade $> 20x$. O projeto provém de uma colaboração para o sequenciamento de larga escala do genomas de *Salmonella*, no qual se obteria uma cobertura em média de $30x$, e se considerou sequenciamentos com uma cobertura acima de $10x$. Por este motivo, na comparação manual usando linhagens referência, não apresentaram uma total cobertura horizontal, sendo possível que existam genes e regiões plasmidiais perdidos. Porém na avaliação da completude da montagem com a detecção de genes conservados nos procariotos, usando a ferramenta BUSCO e checkm se detectou alguns genes faltantes e fragmentados e em média uma adequada completude $>99.62\%$.

A partir dos dados obtidos neste capítulo, observamos que existe uma ampla diversidade de linhagens de *S. Typhimurium* circulando no Peru, uma vez que foram identificadas nos maiores e diversos referenciais clados alfa e beta. Além disso, detectamos pelo menos 10 populações diferenciadas pelo conteúdo dos genes acessórios e filogenia. Nenhuma linhagem global pertence aos filogrupos do Peru, assim, seria necessário um número maior de amostras representativas para confirmar transmissões globais. No entanto, é interessante destacar que existem duas populações clonais no Peru, que não possuem genes AMR e que se espalharam entre os anos 2000-2001 e 2005-2006, e populações MDR isoladas a partir de 2015. Ressaltamos então, que tal fenômeno pode ser confirmado através da filogenia temporária, e se requer a detecção dos fatores genéticos que ajudaram no processo de seleção e disseminação.

Outro ponto importante deste Capítulo foi que caracterizamos uma variedade de famílias de plasmídeos conhecidos (IncHI2A, IncI1-I(Alpha), Col(pHAD28), IncI-gamma/k1) associados à resistência antimicrobiana, não analisamos relacionados a virulência, e vários plasmídeos não foram tipificados pela ausência de regiões de sequência. O sucesso de linhagens (SC8, SC9, SC2) carregando um mosaico de plasmídeos permite-nos questionar sua permanência, competência, fitness e transmissão. Não foi possível relacionar totalmente a família de plasmídeos a perfis de genes AMR. Além disso, recomenda-se realizar a filogenia de plasmídeos e identificação dos elementos transponíveis que atuam em conjunto para uma melhor compreensão da origem, relação e transmissão da resistência antimicrobiana. Duas

instituições hospitalares seriam focos de disseminação das linhagens multidrogas resistentes, pelo qual se recomenda uma vigilância e controle dos locais.

Baixos valores de sensibilidade na correspondência genótipo-fenótipo da resistência, não permitem recomendar o uso do genoma como um sistema de predição da resistência antimicrobiana. Dessa forma, observamos que isolados geneticamente susceptíveis exibem resistência fenotípica. A falta de detecção de marcadores AMR poderia se explicar pela qualidade do sequenciamento e uma parcial montagem em amplitude. Outros fatores associados seriam as incompletas bases de dados, devido ao desconhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na interação com o antibiótico (ex. nitrofurantoína); e a ausência da abordagem de outras ômicas, como a atuação dos sinais ambientais sob a expressão gênica de genes intrínsecos de AMR. Neste trabalho, não analisamos se o grande número de mutações estava localizado em regiões promotoras ou reguladoras e que poderiam também modular a resistência antimicrobiana. A predição da susceptibilidade antimicrobiana, usando a técnica de microdiluição e um número representativo de fenótipos e populações deveria se considerar para uma melhor compreensão da correspondência genótipo-fenótipo.

A resistência à nitrofurantoína apresenta uma tendência a diminuir nos anos seguintes e não foi associada a genótipos conhecidos, assim com o análises de GWAS se identificou oito novos SNVs com potencial de alterar a função proteica. Um conjunto de mutações podem afetar funcionalmente, porém elas também são encontradas em linhagens com fenótipo suscetível, pertencentes à mesma população. Questões como o porquê substituições não sinônimas com potencial de alterar a função proteica foram fixadas na população por seleção positiva ou não. Adicionais resultados não mostrados revelam que SNVs não sinônimos, associadas a linhagens pertencentes a uma mesma população, possuem resistência ao ácido nalidíxico, amoxicilina com ácido clavulânico e tetraciclina.

6.2 CAPÍTULO II

Nós reportamos pelo menos três populações, pela diferenciação de SNVs, genes acessórios, filogenia e cgMLST, circulando entre os isolados peruanos do porquinho-da-Índia, pertencendo ao clado alfa que está representado por isolados de animais de criação, surtos e estão sob seleção antropogênica. O cluster HC100_9757 apresenta o maior número de linhagens resistentes a antimicrobianos, e linhagens do cluster HC100_9460 são classificadas como variante monofásica e carregam um fago de virulência; porém as populações coexistem

sem uma aparente prevalência entre elas. A análise filogenética não conseguiu relacionar isolados de amostras clínicas e alimentos contaminados ou/e AMR, nem confirmar se as mesmas populações estão circulando entre porquinhos da Índia originados de criação e alimentos, sendo necessário um maior número de representantes populacionais, hospedeiros e locais.

Outro ponto importante deste capítulo é que identificamos no cromossomo das linhagens, 14 ilhas de patogenicidade (SPI1, 2, 3, 5, 6, 9, 12, e 3 operons fimbriais), três fagos de virulência (Gifsy 1, Gifsy2, Fels-1) e um plasmídeo de virulência (IncFIB), que são conhecidos para o gênero e sorovar *Salmonella* Typhimurium, mostrando a virulência de natureza intrínseca nas linhagens procedentes do porquinho-da-Índia de criação, alimentos e humanos. Além disso, não foram identificados diferenças elementos genéticos móveis de virulência nas linhagens pertencentes aos clado-cluster procedentes de porquinhos-da-Índias de criação. A presença de ISs em SPIs e fagos poderia indicar o potencial de transferência e ação moduladora das ISs nos elementos móveis de virulência.

Outro ponto a ser ressaltado é que não conseguimos conferir a variabilidade no conteúdo dos fagos devido a que as comparações foram baseadas em uma referência genômica e porque não contamos com uma quantidade e diversidade de isolados. Além disso, o pangenoma mostrou um reduzido conteúdo de genes repertórios. Apenas um fago de virulência esteve presente em dois grupos populacionais, provavelmente submetidos a seleção e a população reduzida.

A presença do gene de virulência, *sdhA*, esteve na ilha genômica de apenas três linhagens, sem avaliação e associação funcional. No caso do gene *ampH*, encontramos 50% das linhagens pertencentes a duas populações e não confirmamos ser carregado em uma ilha genômica. Algumas mutações presentes no seu domínio PBP estão associadas à resistência à betalactâmicos porém detectamos apenas duas mutações sinônimas no domínio, sem adicionais análises funcionais.

O plasmídeo de virulência IncFIB é comumente presente e conservado nos isolados de *S. Typhimurium*. Nos 25 plasmídeos, encontramos 43 SNPs, com 99.95% da sequência compartilhada. A árvore mostra uma similar distribuição topológica que a filogenia baseada no genoma central, o que indica uma coevolução do plasmídeo e do cromossomo. Porém o core genoma permite mostrar uma ampla diversidade entre as linhagens.

Por sua vez, identificamos quatro plasmídeos da família IncI-gamma-K1, mas o plasmídeo da linhagem SE5 unicamente contém genes AMR, apresentando 2.627 SNPs de

diferença dos outros plasmídeos com uma taxa mutacional de 2.68%. Algumas das variantes estavam contidas em 45 CDs e 1.003 SNPs eram substituições não sinônimas, porém não se consegue interpretar o efeito fitness. Contudo, a análise adicional de filogenia mostra uma estreita relação com outros plasmídeos de resistência da mesma família e procedentes das linhagens humanas.

Reportamos ainda uma reduzida resistência a antibióticos de primeira linha e moderada resistência ao ácido nalidíxico. Em um estudo recente fenotípico nos isolados do porquinho-da-Índia mostrou uma alta resistência aos mesmos antibióticos de primeira linha que reportamos e incluindo resistência à enrofloxacina, nitrofurantoína e colistina. Porém não foi possível reportar marcadores genéticos associados a estes antibióticos devido a falta de conhecimento dos mecanismos envolvidos e genes AMR nas bases de dados. Detectamos somente duas linhagens com perfil de resistência a classe de antibióticos da primeira linha, diferentes perfis de genes para as mesmas classes de antibióticos é reportada em isolados de *S. Typhimurium* de animais domésticos, humanos e alimentos. Diferente perfil de genes pode ser carregado na mesma família de plasmídeos e são ajudados sinergicamente pelas sequências de inserção na transmissão da resistência. Reportamos três famílias conhecidas de plasmídeos associados com a resistência, reportados em isolados de *Salmonella* ao redor do mundo e Peru. A moderada resistência ao ácido nalidíxico se deveria ao seu uso profilático e não controlado nos animais de produção. A resistência a este antibiótico está associada a mutações no *gyrA*, porém uma acumulação das mutações nos genes *qndr* poderia incrementar a resistência a fluoroquinolonas (enrofloxacina, ciprofloxacina), antibióticos de tratamento atual. Finalmente, apresentamos duas novas mutações associadas a cefalosporina e fluoroquinolone, porém é necessário um maior número de amostras contendo a mutação e avaliação fenotípica.

7 CONCLUSÕES

1. Identificamos quatro famílias de plasmídeos de resistência associado a linhagens de grupos populacionais específicos como veículos de transmissão da resistência antimicrobiana em isolados de *S. Typhimurium* de amostras clínicas e veterinárias no Peru.
2. Identificamos a nível genotípico uma reduzida resistência a antibióticos de primeira linha (aminoglicosídeos, tetraciclina, ampicilina, sulfa-trimetropim ou nitrofurantoína) nos isolados de cobaias e moderada resistência antimicrobiana para isolados clínicos do Peru. Recomenda-se o potencial tratamento com o antibiótico cefalosporina de terceira geração contra a infecção.
3. Ao menos para *S. Typhimurium*, o uso do WGS para a predição da resistência antimicrobiana não constitui uma alternativa do teste de susceptibilidade tradicional, devido aos baixos valores de sensibilidade obtidos da correspondência genótipo-fenótipo, mas constitui uma análise complementar.
4. A linhagens de *S. Typhimurium* que circulam entre Peru e Equador, nem as amostras isoladas de porquinho-da-Índia de fazenda e de carne pertencem aos mesmos grupos filogenéticos.

8 PERSPECTIVAS

- Realizar testes de susceptibilidade antimicrobiana de microdiluição dos isolados de amostras clínicas e porquinho-da-Índia, na procura de uma melhor predição do gradiente de resistência antimicrobiana.
- Coletar amostras de centros de criação da cidade de Ancash que tem a maior população de porquinhos da Índia.
- Realizar análises dinâmicas dos determinantes da resistência antimicrobiana dos mais críticos sorovares de *Salmonella* procedentes de amostras de humanos, animais domésticos, e alimentos.
- Realizar testes de susceptibilidade de antimicrobianos não avaliados, mas que foram detectados genotípicamente.
- Realizar análises transcriptômicas para a detecção dos mecanismos da resistência à nitrofurantoína.
- Realizar uma anotação funcional e estruturação da sequência de plasmídeos resistentes isolados de humanos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achtman, M. (2008). Evolution, Population Structure, and Phylogeography of Genetically Monomorphic Bacterial Pathogens. *Annual Review of Microbiology*.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162832>
- Adrian, P. V., Du Plessis, M., Klugman, K. P., & Amyes, S. G. B. (1998). New trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase cassette, dfrXV, inserted in a class 1 integron. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(9), Article 9.
<https://doi.org/10.1128/aac.42.9.2221>
- Allen, H. K. (2010). *Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments* | *Nature Reviews Microbiology*. <https://www.nature.com/articles/nrmicro2312>
- Ashley, R. E., Dittmore, A., McPherson, S. A., Turnbough, C. L., Neuman, K. C., & Osheroff, N. (2017). Activities of gyrase and topoisomerase IV on positively supercoiled DNA. *Nucleic Acids Research*, 45(16), Article 16.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx649>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), Article 2.
<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bentley, S. D., & Parkhill, J. (2015). Genomic perspectives on the evolution and spread of bacterial pathogens. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0488>
- Bhat, K. A., Manzoor, T., Dar, M. A., Farooq, A., Allie, K. A., Wani, S. M., Dar, T. A., Shah, A. A., Bhat, K. A., Manzoor, T., Dar, M. A., Farooq, A., Allie, K. A., Wani, S. M., Dar, T. A., & Shah, A. A. (2022). *Salmonella* Infection and Pathogenesis. In *Enterobacteria*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102061>
- Boolchandani, M., D'Souza, A. W., & Dantas, G. (2019). Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. *Nature Reviews Genetics*, 20(6), Article 6.
<https://doi.org/10.1038/s41576-019-0108-4>
- Branchu, P., Bawn, M., & Kingsley, R. A. (2018). Genome variation and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathovariants. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.00079-18>
- Bush, S. J., Foster, D., Eyre, D. W., Clark, E. L., de Maio, N., Shaw, L. P., Stoesser, N., Peto, T. E. A., Crook, D. W., & Walker, A. S. (2020). Genomic diversity affects the accuracy of bacterial single-nucleotide polymorphism-calling pipelines. *GigaScience*, 9(2), Article 2. <https://doi.org/10.1093/GIGASCIENCE/GIAA007>
- Bushby, S. R., & Hitchings, G. H. (1968). Trimethoprim, a sulphonamide potentiator. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 33(1), Article 1.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1968.tb00475.x>
- Chen, P. E., & Shapiro, B. J. (2015). The advent of genome-wide association studies for bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 25, 17–24.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.03.002>
- Christensen, H., & Olsen, J. E. (2018). *Sequence-Based Classification and Identification of Prokaryotes* (pp. 121–134). Springer, Cham.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-99280-8_7
- Clausen, P. T. L. C., Zankari, E., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2016). Benchmarking of methods for identification of antimicrobial resistance genes in bacterial whole genome

- data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(9), Article 9. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw184>
- CLSI. (2021). *M100Ed31 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 31st Edition*. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
- Cosgrove, S. E. (2006). The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: Mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clinical Infectious Diseases*, 42(SUPPL. 2), Article SUPPL. 2. <https://doi.org/10.1086/499406>
- Croucher, N. J., Page, A. J., Connor, T. R., Delaney, A. J., Keane, J. A., Bentley, S. D., Parkhill, J., & Harris, S. R. (2015). Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1196>
- Crump, J. A., Sjölund-Karlsson, M., Gordon, M. A., & Parry, C. M. (2015). Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive Salmonella infections. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-15>
- Depristo, M. A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl, C., Philippakis, A. A., Del Angel, G., Rivas, M. A., Hanna, M., McKenna, A., Fennell, T. J., Kernysky, A. M., Sivachenko, A. Y., Cibulskis, K., Gabriel, S. B., Altshuler, D., & Daly, M. J. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature Genetics*, 43(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/ng.806>
- Dönhöfer, A., Franckenberg, S., Wickles, S., Berninghausen, O., Beckmann, R., & Wilson, D. N. (2012). Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(42), Article 42. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208037109>
- Dutilh, B. E., Backus, L., Edwards, R. A., Wels, M., Bayjanov, J. R., & Van Hijum, S. A. F. T. (2013). Explaining microbial phenotypes on a genomic scale: Gwas for microbes. *Briefings in Functional Genomics*, 12(4), 366–380. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elt008>
- Eisen, J. A., & Fraser, C. M. (2003). Phylogenomics: Intersection of evolution and genomics. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1086292>
- Eng, S. K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N. S., Ser, H. L., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), Article 3. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- EUCAST. (2021). *EUCAST: Clinical breakpoints and dosing of antibiotics*. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
- Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2003). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics*, 164(4), Article 4. <https://doi.org/10.1093/genetics/164.4.1567>
- FDA. (2021). *Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems—Class II Special Controls Guidance for Industry and FDA | FDA*. <https://www.fda.gov/medical-devices/guidance-documents-medical-devices-and-radiation-emitting-products/antimicrobial-susceptibility-test-ast-systems-class-ii-special-controls-guidance-industry-and-fda>
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1235>

- Fu, S., Hiley, L., Octavia, S., Tanaka, M. M., Sintchenko, V., & Lan, R. (2017). Comparative genomics of Australian and international isolates of *Salmonella* Typhimurium: Correlation of core genome evolution with CRISPR and prophage profiles. *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06079-1>
- Gal-Mor, O. (2019). Persistent infection and long-term carriage of typhoidal and nontyphoidal salmonellae. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-18>
- Gal-Mor, O., Boyle, E. C., & Grassl, G. A. (2014). Same species, different diseases: How and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers in Microbiology*, 5(AUG), Article AUG. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00391>
- Garcia-Migura, L., Sunde, M., Karlsmose, S., Veldman, K., Schroeter, A., Guerra, B., Granier, S. A., Perrin-Guyomard, A., Gicquel-Bruneau, M., Franco, A., Englund, S., Teale, C., Heiska, H., Clemente, L., Boerlin, P., Moreno, M. A., Daignault, D., Mevius, D., Hendriksen, R. S., & Aarestrup, F. M. (2012). Establishing streptomycin epidemiological cut-off values for *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Microbial Drug Resistance*, 18(1), Article 1. <https://doi.org/10.1089/mdr.2011.0064>
- Garneau-Tsodikova, S., & Labby, K. J. (2016). Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: Overview and perspectives. *MedChemComm*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1039/c5md00344j>
- Garrison, E., & Marth, G. (2012). Haplotype-based variant detection from short-read sequencing—Free bayes—Variant Calling—Longranger. *ArXiv Preprint ArXiv:1207.3907*.
- Gaynes, R. (2017). The discovery of penicillin—New insights after more than 75 years of clinical use. *Emerging Infectious Diseases*, 23(5), Article 5. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161556>
- Georgina Solano-Gálvez, S., Fernanda Valencia-Segrove, M., José Ostos Prado, M., Berenice López Boucieguez, A., Abelardo Álvarez-Hernández, D., & Vázquez-López, R. (2021). Mechanisms of Resistance to Quinolones. In *Antimicrobial Resistance—A One Health Perspective*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92577>
- Gibson, M. K., Forsberg, K. J., & Dantas, G. (2015). Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. *ISME Journal*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.106>
- Grossman, T. H. (2016). Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(4), Article 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025387>
- Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P. I., Bockemühl, J., Grimont, P. A. D., & Weill, F. X. (2010). Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, 161(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.10.002>
- Guillermo, S. R., Rocío, R., Ana, C. O., Iván, R. W., Raúl, R. A., & Lenin, M. H. (2018). Antimicrobial resistance and genotyping of salmonella typhimurium strains isolated from Guinea pigs (*cavia porcellus*) from intensive production farms of the city of lima, Peru. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 29(1), 319–327. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V29I1.14089>
- Gupta, S. K., Padmanabhan, B. R., Diene, S. M., Lopez-Rojas, R., Kempf, M., Landraud, L., & Rolain, J. M. (2014). ARG-annot, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.01310-13>
- Hansen, L. H., Jensen, L. B., Sørensen, H. I., & Sørensen, S. J. (2007). Substrate specificity

- of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(1), Article 1. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm167>
- Haselbeck, A. H., Panzner, U., Im, J., Baker, S., Meyer, C. G., & Marks, F. (2017). Current perspectives on invasive nontyphoidal *Salmonella* disease. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 30(5), Article 5. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000398>
- Helms, M., Ethelberg, S., Mølbak, K., Lightfoot, D., Powling, J., Berghold, C., Kornshober, C., Wybo, I., Collard, J. M., Godard, C., Dos Prazeres Rodrigues, D., Dos Reis, E. M. F., Fonseca, E. L., Doré, K., Flint, J., Pollari, F., Ahmed, R., Demczuk, W., Hospedales, J., ... Stevenson, J. E. (2005). International *Salmonella typhimurium* DT104 infections, 1992-2001. *Emerging Infectious Diseases*, 11(6), Article 6. <https://doi.org/10.3201/eid1106.041017>
- Hendriksen, R. S., Bortolaia, V., Tate, H., Tyson, G. H., Aarestrup, F. M., & McDermott, P. F. (2019). Using Genomics to Track Global Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Public Health*, 7(September), Article September. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00242>
- Hendriksen, R. S., Vieira, A. R., Karlslose, S., Lo Fo Wong, D. M. A., Jensen, A. B., Wegener, H. C., & Aarestrup, F. M. (2011). Global monitoring of salmonella serovar distribution from the world health organization global foodborne infections network country data bank: Results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease*. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0787>
- Hooper, D. C., & Jacoby, G. A. (2015). Mechanisms of drug resistance: Quinolone resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354(1), Article 1. <https://doi.org/10.1111/nyas.12830>
- Huamán, M., Pérez, C., Rodríguez, J., Killerby, M., Lovón, S., & Chauca, L. (2020). Genetic characterization and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Typhimurium in guinea pigs under intensive breeding. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 31(1). <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V31I1.17542>
- Hunt, M., Mather, A. E., Sánchez-Busó, L., Page, A. J., Parkhill, J., Keane, J. A., & Harris, S. R. (2017). ARIBA: Rapid antimicrobial resistance genotyping directly from sequencing reads. *Microbial Genomics*. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000131>
- Huson, D. H., & Steel, M. (2004). Phylogenetic trees based on gene content. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth198>
- Id, M. B., Alikhan, N.-F., Tan Thilliez Id, G., Kirkwood Id, M., Wheelerid, N. E., Petrovska, L., Dallman, T. J., Adriaenssensid, E. M., Hallid, N., & Kingsleyid, R. A. (2020). *Evolution of Salmonella enterica serotype Typhimurium driven by anthropogenic selection and niche adaptation*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008850>
- Inouye, M., Dashnow, H., Raven, L. A., Schultz, M. B., Pope, B. J., Tomita, T., Zobel, J., & Holt, K. E. (2014). SRST2: Rapid genomic surveillance for public health and hospital microbiology labs. *Genome Medicine*, 6(11), Article 11. <https://doi.org/10.1186/s13073-014-0090-6>
- Jaillard, M., Lima, L., Tournoud, M., Mahé, P., van Belkum, A., Lacroix, V., & Jacob, L. (2018). A fast and agnostic method for bacterial genome-wide association studies: Bridging the gap between k-mers and genetic events. *PLoS Genetics*, 14(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007758>
- Jain, P., Sudhanthirakodi, S., Chowdhury, G., Joshi, S., Anandan, S., Ray, U.,

- Mukhopadhyay, A., & Dutta, S. (2018). Antimicrobial resistance, plasmid, virulence, multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium clinical and environmental isolates from India. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207954>
- Jia, B., Raphenya, A. R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K. K., Lago, B. A., Dave, B. M., Pereira, S., Sharma, A. N., Doshi, S., Courtot, M., Lo, R., Williams, L. E., Frye, J. G., Elsayegh, T., Sardar, D., Westman, E. L., Pawlowski, A. C., ... McArthur, A. G. (2017). CARD 2017: Expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1004>
- Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11), Article 11. <https://doi.org/10.1086/647952>
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, 37(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>
- Kingsley, R. A., Msefula, C. L., Thomson, N. R., Kariuki, S., Holt, K. E., Gordon, M. A., Harris, D., Clarke, L., Whitehead, S., Sangal, V., Marsh, K., Achtman, M., Molyneux, M. E., Cormican, M., Parkhill, J., MacLennan, C. A., Heyderman, R. S., & Dougan, G. (2009). Epidemic multiple drug resistant *Salmonella* Typhimurium causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype. *Genome Research*, 19(12), 2279–2287. <https://doi.org/10.1101/gr.091017.109>
- Klemm, E., & Dougan, G. (2016). Advances in Understanding Bacterial Pathogenesis Gained from Whole-Genome Sequencing and Phylogenetics. *Cell Host and Microbe*. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.015>
- Klemm, E. J., Shakoor, S., Page, A. J., Qamar, F. N., Judge, K., Saeed, D. K., Wong, V. K., Dallman, T. J., Nair, S., Baker, S., Shaheen, G., Qureshi, S., Yousafzai, M. T., Saleem, M. K., Hasan, Z., Dougan, G., & Hasan, R. (2018). Emergence of an extensively drug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhi clone harboring a promiscuous plasmid encoding resistance to fluoroquinolones and third-generation cephalosporins. *MBio*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1128/mBio.00105-18>
- Kobayashi, T., Nonaka, L., Maruyama, F., & Suzuki, S. (2007). Molecular evidence for the ancient origin of the ribosomal protection protein that mediates tetracycline resistance in bacteria. *Journal of Molecular Evolution*, 65(3), Article 3. <https://doi.org/10.1007/s00239-007-9006-z>
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 423–435. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>
- Kombade, S., & Kaur, N. (2021). *Pathogenicity Island in Salmonella*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96443>
- Kurtz, J. R., Goggins, J. A., & McLachlan, J. B. (2017). *Salmonella* infection: Interplay between the bacteria and host immune system. *Immunology Letters*, 190, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.006>
- Lakin, S. M., Dean, C., Noyes, N. R., Dettenwanger, A., Ross, A. S., Doster, E., Rovira, P., Abdo, Z., Jones, K. L., Ruiz, J., Belk, K. E., Morley, P. S., & Boucher, C. (2017). MEGARes: An antimicrobial resistance database for high throughput sequencing. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), Article D1. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1009>
- Lan, R., Reeves, P. R., & Octavia, S. (2009). Population structure, origins and evolution of

- major *Salmonella enterica* clones. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 9(5), Article 5. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2009.04.011>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lees, J. A., Galardini, M., Bentley, S. D., Weiser, J. N., & Corander, J. (2018). pyseer: A comprehensive tool for microbial pangenome-wide association studies. *Bioinformatics*, 34(24), 4310–4312. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty539>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), Article 16. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, R., Lai, J., Wang, Y., Liu, S., Li, Y., Liu, K., Shen, J., & Wu, C. (2013). Prevalence and characterization of *Salmonella* species isolated from pigs, ducks and chickens in Sichuan Province, China. *International Journal of Food Microbiology*, 163(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.020>
- Lilia Chauca, L. C. F., Marco Zaldivar Abanto, Juan Muscari Greco, Rosa Higaonna Oshiro, ulio Gamarra Montenegro, Amarante Florian Alcantara. (1995). *PROYECTO SISTEMAS DE PRODUCCION DE CUYES INIA - CIID*. https://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/341/1/sistemas_de_produccion_de_cuyes.pdf
- Lippert, C., Listgarten, J., Liu, Y., Kadie, C. M., Davidson, R. I., & Heckerman, D. (2011). FaST linear mixed models for genome-wide association studies. *Nature Methods*, 8(10), 833–835. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1681>
- Loman, N. J., & Pallen, M. J. (2015). Twenty years of bacterial genome sequencing. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3565>
- Lysnyansky, I., Gerchman, I., Mikula, I., Gobbo, F., Catania, S., & Levisohn, S. (2013). Molecular Characterization of Acquired Enrofloxacin Resistance in *Mycoplasma synoviae* Field Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), Article 7. <https://doi.org/10.1128/AAC.00203-13>
- Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., & Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3140>
- Maiden, M. C. J., Van Rensburg, M. J. J., Bray, J. E., Earle, S. G., Ford, S. A., Jolley, K. A., & McCarthy, N. D. (2013). MLST revisited: The gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 11(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3093>
- Marchello, C. S., Carr, S. D., & Crump, J. A. (2020). A systematic review on antimicrobial resistance among salmonella typhi worldwide. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(6), Article 6. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0258>
- Matsuura S., A., Morales C., S., Calle E., S., & Ara G., M. (2010). Susceptibilidad a antibacterianos in vitro de *Salmonella enterica* aislada de cuyes de crianza familiar-comercial en la provincia de Carhuaz, Áncash. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 21(1), 93–99.
- McDermott, P. F., Tyson, G. H., Kabera, C., Chen, Y., Li, C., Folster, J. P., Ayers, S. L., Lam, C., Tate, H. P., & Zhao, S. (2016). Whole-genome sequencing for detecting antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *Antimicrobial Agents and*

- Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.01030-16>
- McInerney, J. O., McNally, A., & O'Connell, M. J. (2017). Why prokaryotes have pangenomes. *Nature Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.40>
- McMillan, E. A., Gupta, S. K., Williams, L. E., Jové, T., Hiott, L. M., Woodley, T. A., Barrett, J. B., Jackson, C. R., Wasilenko, J. L., Simmons, M., Tillman, G. E., McClelland, M., & Frye, J. G. (2019). Antimicrobial resistance genes, cassettes, and plasmids present in salmonella enterica associated with United States food animals. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00832>
- Mensah, N., Tang, Y., Cawthraw, S., Abuoun, M., Fenner, J., Thomson, N. R., Mather, A. E., & Petrovska-Holmes, L. (2019). Determining antimicrobial susceptibility in Salmonella enterica serovar Typhimurium through whole genome sequencing: A comparison against multiple phenotypic susceptibility testing methods. *BMC Microbiology*. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1520-9>
- MINSA. (2019). Boletín epidemiológico del Perú. *Boletín Epidemiológico Del Perú, Volumen(28)*. www.dge.gob.p
- Morales, S., Mattos, J., & Calle, S. (2007a). *Efecto de la muña (Satureja parvifolia) en La dinámica de la infección de Salmonella entérica en cobayos*.
- Morales, S., Mattos, J., & Calle, S. (2007b). *Efecto de la muña (Satureja parvifolia) en La dinámica de la infección de Salmonella entérica en cobayos*.
- Neuert, S., Nair, S., Day, M. R., Doumith, M., Ashton, P. M., Mellor, K. C., Jenkins, C., Hopkins, K. L., Woodford, N., de Pinna, E., Godbole, G., & Dallman, T. J. (2018). Prediction of phenotypic antimicrobial resistance profiles from whole genome sequences of non-typhoidal Salmonella enterica. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR), Article MAR. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00592>
- Parkhill, J., Wren, B. W., Thomson, N. R., Titball, R. W., Holden, M. T. G., Prentice, M. B., Sebahia, M., James, K. D., Churcher, C., Mungall, K. L., Baker, S., Basham, D., Bentley, S. D., Brooks, K., Cerdão-Tárraga, A. M., Chillingworth, T., Cronin, A., Davies, R. M., Davis, P., ... Barrell, B. G. (2001). Genome sequence of Yersinia pestis, the causative agent of plague. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35097083>
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*, 25(7), 1043–1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Pearce, M. E., Alikhan, N. F., Dallman, T. J., Zhou, Z., Grant, K., & Maiden, M. C. J. (2018). Comparative analysis of core genome MLST and SNP typing within a European Salmonella serovar Enteritidis outbreak. *International Journal of Food Microbiology*, 274, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.023>
- Poole, K. (2004). Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00763.x>
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., De Bakker, P. I. W., Daly, M. J., & Sham, P. C. (2007). PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*. <https://doi.org/10.1086/519795>
- Quesada, A., Reginatto, G. A., Español, A. R., Colantonio, L. D., & Burrone, M. S. (2016). Antimicrobial resistance of Salmonella spp isolated animal food for human consumption. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 33(1), 32–44. <https://doi.org/10.17843/RPMESP.2016.331.1899>

- Quino, W., Caro-Castro, J., Mestanza, O., Hurtado, C. V., Zamudio, M. L., & Gavilan, R. G. (2020). Phylogenetic structure of Salmonella Enteritidis provides context for a foodborne outbreak in Peru. *Scientific Reports*, *10*(1), 22080. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78808-y>
- Quino, W., Hurtado, C. V., Escalante-Maldonado, O., Flores-León, D., Mestanza, O., Vences-Rosales, F., Zamudio, M. L., & Gavilán, R. G. (2019). Multidrogorresistencia de Salmonella infantis en Perú: Un estudio mediante secuenciación de nueva generación. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, *36*(1), 37. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2019.361.3934>
- Quino, W., Hurtado, C. V., Meza, A. M., Zamudio, M. L., & Gavilan, R. G. (2020). Patrones de resistencia a los antimicrobianos en serovares de Salmonella enterica en Perú, 2012-2015. *Rev. chil. infectol*, 395–401.
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, *13*(6), Article 6. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2010.08.003>
- Ramirez-Hernandez, A., Galagarza, O. A., Rodriguez, M. V. Á., Vera, E. P., Ortiz, M. del C. V., Deering, A. J., & Oliver, H. F. (2020). Food safety in Peru: A review of fresh produce production and challenges in the public health system. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *19*(6), 3323–3342. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12647>
- Reece, R. J., Maxwell, A., & Wang, J. C. (1991). DNA gyrase: Structure and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *26*(3–4), Article 3–4. <https://doi.org/10.3109/10409239109114072>
- Ríos C, A., Morales-Cauti, S., Vilca L, M., Carhuallanqui P, A., & Ramos D, D. (2019). Determinación del perfil de resistencia antibiótica de Salmonella enterica aislada de cerdos faenados en un matadero de Lima, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, *30*(1), Article 1. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V30I1.15701>
- Robertson, J., & Nash, J. H. E. (2018). MOB-suite: Software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. *Microbial Genomics*, *4*(8). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000206>
- Rokas, A., Williams, B. I., King, N., & Carroll, S. B. (2003). Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature02053>
- San, J. E., Baichoo, S., Kanzi, A., Moosa, Y., Lessells, R., Fonseca, V., Mogaka, J., Power, R., & de Oliveira, T. (2020). Current Affairs of Microbial Genome-Wide Association Studies: Approaches, Bottlenecks and Analytical Pitfalls. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 3119. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03119>
- Sánchez, M., & Cardona, N. (2003). *Mecanismos de interacción de Salmonella con la mucosa intestinal*. <https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=14836>
- Sandegren, L., Lindqvist, A., Kahlmeter, G., & Andersson, D. I. (2008). Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in Escherichia coli. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *62*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn222>
- Silva, C., Betancor, L., García, C., Astocondor, L., Hinojosa, N., Bisio, J., Rivera, J., Perezgasga, L., Pérez Escanda, V., Yim, L., Jacobs, J., García-del Portillo, F., SalmoIber CYTED Network, the, Chabalgoity, J. A., & Puente, J. L. (2017). *Characterization of Salmonella enterica isolates causing bacteremia in Lima, Peru, using multiple typing methods to JLP; Directorate General for Development Cooperation of the Belgian Government (Framework Agreement 3, Project 95502) to CG; Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED,*

- 215RT0493) and Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness and European Regional Funds for. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189946>
- Sköld, O. (2000). Sulfonamide resistance: Mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates*, 3(3), Article 3. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0146>
- Spratt, B. G., Hanage, W. P., Li, B., Aanensen, D. M., & Feil, E. J. (2004). Displaying the relatedness among isolates of bacterial species—The eBURST approach. *FEMS Microbiology Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.11.015>
- Su, M., Satola, S. W., & Read, T. D. (2019). Genome-based prediction of bacterial antibiotic resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(3), Article 3. <https://doi.org/10.1128/JCM.01405-18>
- Tack, B., Vanaenrode, J., Verbakel, J. Y., Toelen, J., & Jacobs, J. (2020). Invasive non-typhoidal Salmonella infections in sub-Saharan Africa: A systematic review on antimicrobial resistance and treatment. *BMC Medicine*, 18(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01652-4>
- Tettelin, H., Riley, D., Cattuto, C., & Medini, D. (2008). Comparative genomics: The bacterial pan-genome. *Current Opinion in Microbiology*, 11(5), Article 5. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.006>
- Tonkin-Hill, G., Lees, J. A., Bentley, S. D., Frost, S. D. W., & Corander, J. (2018). RhierBAPS: An R implementation of the population clustering algorithm hierBAPS. *Wellcome Open Research*, 3. <https://doi.org/10.12688/WELLCOMEOPENRES.14694.1>
- Tran, J. H., & Jacoby, G. A. (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8), Article 8. <https://doi.org/10.1073/pnas.082092899>
- Treangen, T. J., & Rocha, E. P. C. (2011). Horizontal transfer, not duplication, drives the expansion of protein families in prokaryotes. *PLoS Genetics*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001284>
- Tükel, C., Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R. P., Akçelik, M., & Bäumlner, A. J. (2006). Neutrophil influx during non-typhoidal salmonellosis: Who is in the driver's seat? *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 46(3), Article 3. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00051.x>
- Uzzau, S., Brown, D. J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Casadesús, J., Platt, D. J., & Olsen, J. E. (2000). Host adapted serotypes of Salmonella enterica. *Epidemiology and Infection*, 125(2), Article 2. <https://doi.org/10.1017/S0950268899004379>
- Van Puyvelde, S., Pickard, D., Vandelannoote, K., Heinz, E., Barbé, B., de Block, T., Clare, S., Coomber, E. L., Harcourt, K., Sridhar, S., Lees, E. A., Wheeler, N. E., Klemm, E. J., Kuijpers, L., Mbuyi Kalonji, L., Phoba, M. F., Falay, D., Ngbonda, D., Lunguya, O., ... Deborggraeve, S. (2019). An African Salmonella Typhimurium ST313 sublineage with extensive drug-resistance and signatures of host adaptation. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11844-z>
- Wang, H. C., Susko, E., & Roger, A. J. (2019). The Relative Importance of Modeling Site Pattern Heterogeneity Versus Partition-Wise Heterotachy in Phylogenomic Inference. *Systematic Biology*, 68(6), 1003–1019. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syz021>
- Wang, X., Biswas, S., Paudyal, N., Pan, H., Li, X., Fang, W., & Yue, M. (2019). Antibiotic resistance in salmonella typhimurium isolates recovered from the food chain through national antimicrobial resistance monitoring system between 1996 and 2016. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00985>

- World Health Organization. Regional Office for Europe. (2017). *WHO Regional Office for Europe Antimicrobial Medicines Consumption (AMC) Network: AMC data 2011–2017: executive summary*. World Health Organization. Regional Office for Europe. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330614>
- Worthington, R. J., & Melander, C. (2013). Overcoming resistance to β -Lactam antibiotics. *Journal of Organic Chemistry*, 78(9), Article 9. <https://doi.org/10.1021/jo400236f>
- Wright, G. D. (2010). Q&A: Antibiotic resistance: Where does it come from and what can we do about it? *BMC Biology*, 8. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-123>
- Zamudio, M. L., Meza, A., Bailón, H., Martínez-Urtaza, J., & Campos, J. (2011). Experiencias en la vigilancia epidemiológica de agentes patógenos transmitidos por alimentos a través de electroforesis en campo pulsado (PFGE) en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. <https://doi.org/10.17843/rpmpesp.2011.281.467>
- Zango, U. U., Ibrahim, M., Abdurrahman, S., Shawai, A., & Shamsuddin, I. M. (2019). A review on β -lactam antibiotic drug resistance. *MOJ Drug Des Develop Ther.*, 3(2), Article 2. <https://doi.org/10.15406/mojddt.2019.03.00080>
- Zankari, E., Allesøe, R., Joensen, K. G., Cavaco, L. M., Lund, O., & Aarestrup, F. M. (2017). PointFinder: A novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(10), Article 10. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx217>
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F. M., & Larsen, M. V. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), Article 11. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>
- Zhang, S., Li, S., Gu, W., Den Bakker, H., Boxrud, D., Taylor, A., Roe, C., Driebe, E., Engelthaler, D. M., Allard, M., Brown, E., McDermott, P., Zhao, S., Bruce, B. B., Trees, E., Fields, P. I., & Deng, X. (2019). Zoonotic source attribution of *Salmonella enterica* serotype typhimurium using genomic surveillance data, United States. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid2501.180835>
- Zhou, Z., Alikhan, N.-F., Mohamed, K., Fan, Y., & Achtman, M. (2020). The Enterobase user's guide, with case studies on *Salmonella* transmissions, *Yersinia pestis* phylogeny, and *Escherichia* core genomic diversity. *Genome Research*, 30(1), Article 1. <https://doi.org/10.1101/gr.251678.119>

10 ANEXO

INFORME TÉCNICO

A. Montagem de genoma

- As amostras estudadas nos capítulos I e II foram sequenciadas usando a tecnologia Illumina HiSeq, com bibliotecas pareadas.
- A qualidade das sequências reads foram avaliadas por meio das ferramentas FastQC, CheckM e sequence reads, valores PHRED inferiores a 20x foram removidas das amostras no capítulo II.
- A montagem foi conduzida utilizando três ferramentas/pipelines (Spades, Unicycler, Newbler) e os resultados foram comparados utilizando o software Quast.
- Para a circularização dos genomas, realizou-se o mapeamento das sequência reads nos contigs, utilizando as ferramentas GapFiller e SPAdes. Seguidamente, o programa Contiguator foi empregado juntamente com um genoma circular de referência para a geração de sequências de scaffolds contendo regiões "N".
- Os espaços vazios nos scaffolds foram preenchidos utilizando outros resultados de montagens, usando o GenomeFinisher.
- Os gaps remanescentes foram fechados manualmente, empregando a sequência consenso gerada a partir do mapeamento contra uma ou mais cepas de referência. O fechamento foi realizado de maneira manual, gap por gap, considerando, no mínimo, uma cobertura de 5 sequências no gap.

A.1. Avaliação da qualidade de sequência reads (ferramentas e linhas de comando)

fastQC

```
$ fastqc *fastq
```

Trimomatic

```
$ java -jar trimmomatic-0.39.jar PE -threads 12 R1.fastq.gz R2.fastq.gz forward_paired.fq.gz
forward_unpaired.fq.gz reverse_paired.fq.gz reverse_unpaired.fq.gz ~
```

```
ILLUMINACLIP:~/Trimmomatic-0.39/adapters/TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:3
TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:10 MINLEN:50
```

A.2. Comandos para geração de contigs

Spades

```
$ ~/spades.py --illumina -o diretório_de_saida -s1 forward_paired.fq -s2 reverse_paired.fq
```

Newbler

```
$ ~/runAssembly -rip -m -cpu 16 -scaffold -o diretório_de_saida forward_paired.fq
reverse_paired.fq
```

Unicycler

```
$~/unicycler --spades_path ~/spades.py --samtools_path ~/samtools --pilon_path
~/pilon-1.22.jar -1 reads_1.fastq.gz -2 reads_2.fastq.gz -o output_dir --no_correct --threads 12
```

A.3. Fechamento do genoma circular:

Gapfiller

```
$ perl gapfiller -l library-gapfiller.txt -s sspace/ssize.final.scaffolds.fasta -T 12 -b gapfiller
```

SSpace

```
$ perl ssize -l library-ssize.txt -s gapfiller/gapfiller.gapfilled.final.fa -k 5 -a 0.7 -x 1 -m 30
-o 20 -T 12 -b ssize
```

Contiguator

```
$ ./CONTIGuatorF.py -r genome.fna -g genome.gbk -c scaffolds.fasta
```

Gfinisher (Interfaze gráfica)

Quast

```
$ ./quast contigs_genome.fasta -o path_folder -r genome_reference.fasta
```

checkM

```

$./checkm2 predict --threads 30 --input <folder_with_bins> --output-directory
<output_folder>

```

A.4. Chamado de Variantes e Análise GWAS

- A predição de variantes foi feita usando o pipeline Snippy.
- Inclui a ferramenta bwa mem para o mapeamento de sequências reads contra um genoma referência.
- O samtools é usado para filtrar reads de qualidade de mapeamento menor a 20.
- A ferramenta Freebayes faz o chamado de variantes considerando os seguintes parâmetros: cobertura >5 reads, uma qualidade de mapeamento > 50, e um mínimo de mapeamento de qualidade >20 e exclusão de indels.
- O snippy conta com dois códigos *in-house* para a filtragem de SNPs e para a anotação de variantes: o qual identifica o tipo de variantes sinônima e não sinônima e se está incluída numa região codificante, entre outras informações detalhadas no arquivo de saída tab.
- Finalmente com a ferramenta vcf-consensus gera uma sequência consenso de variantes.

Snippy

```

$ snippy --cpus 6 --mincov 5 --outdir strainname --ref ref.gbk --R1 R1.fastq.gz --R2
R2.fastq.gz
{ $ bwa mem -v 2 -M -R @RG\tID:snps\tSM:snps -t 6 reference/ref.fa ~/R1.fastq.gz
~/R2.fastq.gz
$ ~/samtools index snps.bam
$ ~/samtools depth -aa -q 20 snps.bam | bgzip > snps.depth.gz
$ ~/tabix -s 1 -b 2 -e 2 snps.depth.gz
$ ~/fasta_generate_regions.py reference/ref.fa.fai 202155 > reference/ref.txt
$ ~/freebayes-parallel reference/ref.txt 6 -p 1 -q 20 -m 60 --min-coverage 5 -V -f
reference/ref.fa snps.bam > snps.raw.vcf
$ ~/snpeff ann -no-downstream -no-upstream -no-intergenic -no-utr -c reference/snpeff.config
-dataDir . -noStats ref snps.filt.vcf > snps.vcf

```

```
$ ~/snippy/bin/snippy-vcf_filter --minqual 10 --mincov 5 --minfrac 0.9 snps.raw.vcf >
snps.filt.vcf
$ ~/snippy/bin/snippy-vcf_to_tab --gff reference/ref.gff --ref reference/ref.fa --vcf snps.vcf >
snps.tab
$ vcf-consensus snps.vcf.gz < reference/ref.fa > snps.consensus.fa}
```

A.5. Teste de Associação

- O primeiro passo foi remover SNPs que estejam presentes numa frequência alélica menor de 0.05 nas amostras usando a ferramenta vcftools.
- Se realizou o teste de associação Chi-quadrado a um nível de significância de 0.05 e os valores foram corrigidos para teste multiple, neste caso pelo número de variantes avaliadas, usando o método bonferroni, resultando em variantes associadas ao fenótipo com um nível de significância menor a $p < 0.0000509$.
- O teste de associação e o manhattan plot foi feito com o pacote em R qqman.
- Assim mesmo nós realizamos o testes qqplot para conhecer se nossas variantes preditas são dependentes de outras variáveis, para isto realizamos o teste de qqplot. Conferindo que provavelmente estariam associadas ao grupo populacional.
- Realizamos a correção da estruturação populacional usando o teste de regressão logística Firth, um modelo específico para datasets pequenos.
- O fluxo consiste em converter o arquivo vcf a formato plink, e informar que se analisa sequência haplóide. Seguido realizamos as análises e selecionamos os primeiros seis componentes principais, que seriam as co-variáveis contínuas. Realizamos o teste de regressão logística linear e a correção de Bonferroni, para a seleção das variantes associadas aos fenótipos.

```
$ vcftools --vcf snps.vcf --plink --maf 0.05 --out myplink
```

```
$ plink --file myplink --recodeA --out salmonella_snps
```

Detalhes: Teste de associação em R : <https://github.com/raquelhurtado/Workflow-WGS-AMR/>
 Alteração do teste de Regressão logística em R
 :<https://github.com/vicbp1/Genetic-Architecture-of-Zika>.

RESULTADOS ADICIONAIS 1 -CAPÍTULO 1

Foi criado um guia com os comandos e códigos para os análises genômicos e de resistência antimicrobiana para *S. Typhimurium* utilizados no Capítulo 1. O protocolo Workflow WGS-AMR está no arquivo README.md no GITHUB. Link: <https://github.com/raquelhurtado/Workflow-WGS-AMR/blob/main/README.md>

RESULTADOS ADICIONAIS 2 -CAPÍTULO 1

Avaliamos a distribuição e tendência temporal da resistência antimicrobiana fenotípica e genotípica. A tendência da resistência foi avaliada usando o teste de chi-quadrado usando o pacote rstatix in R. Nós identificamos um aumento da resistência fenotípica para a nitrofurantoína ($p=0.0047$) nos anos 2006-2007, e ácido nalidíxico ($p=3.79e-06$), tetraciclina ($7.74e-06$), e sulfatrimetropima (0.0126) após o ano 2015 (Figure 1). Nós demonstramos também genotipicamente resistência para o ácido nalidíxico ($p=3.9e-09$) e tetraciclina (0.000048), concluindo que encontramos um aumento da resistência genotípica e fenotípica para NA e TE nos últimos anos. Por outro lado, encontramos uma redução da resistência fenotípica a nitrofurantoína com o passar dos anos, sem correspondência genotípica, e isso pode ser devido a proibição do uso da nitrofurantoína na criação de animais de produção (Quesada et al., 2016) e ao desconhecimento dos mecanismos de ação do antibiótico na bactéria.

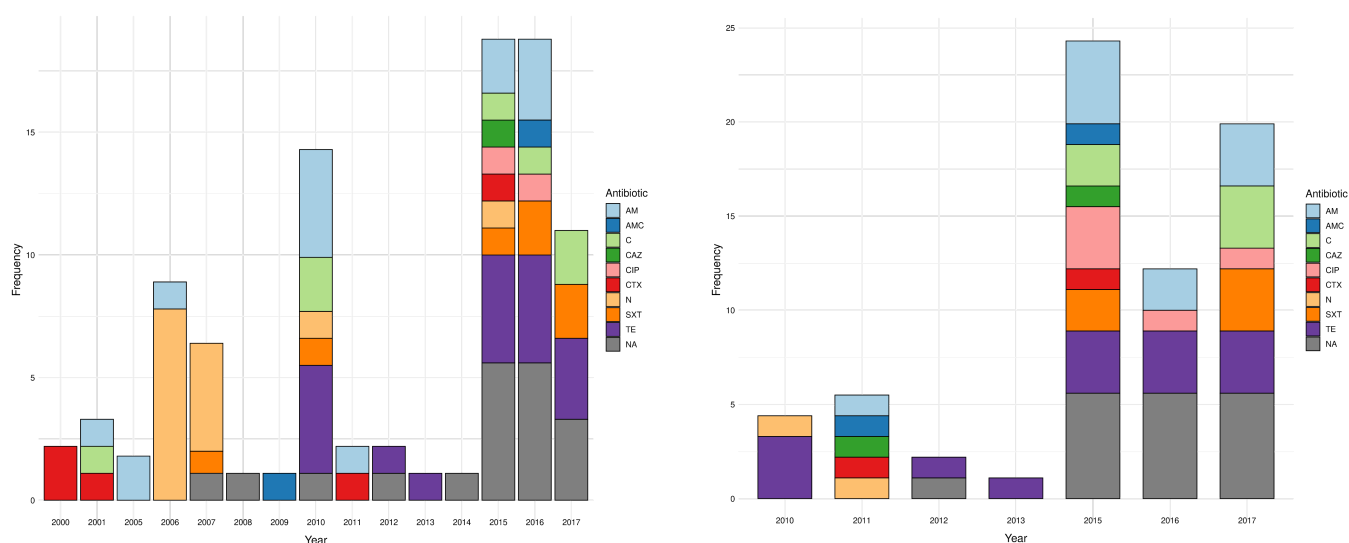


Figura 1. Frequência da resistência fenotípica (A) e genotípica (B) de 90 *S. Typhimurium* ao longo de 17 anos.

RESULTADOS ADICIONAIS 3 -CAPÍTULO I

Seguindo a avaliação da qualidade do sequenciamento identificamos adequados valores de completude e nível de contaminação usando checkM. Acordo a classificação pelo Parks (Parks et al., 2015), 83 genomas apresentam uma alta completude com valores no rango de 99.05% a 100% (média = 99.62), cinco genomas com uma média de 98.85% de completude e dois genomas (FD01852587, FD01851369) muestran valores de 96.21% e 95.00%. Os resultados de baixa contaminação foram para a maioria <0.96% (média = 0.22%) e para o genoma FD01852653 foi o maior valor, 1.36%.

B. As principais publicações e atividades realizadas durante o período do doutorado (2019-2023) estão listadas abaixo:

- Produção científica

1. Comparative genomic analysis of ovine and other host associated isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit the important role of mobile genetic elements and virulence factors in host adaptation. *Gene* 2023. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.147131>

Gene 855 (2023) 147131



Comparative genomic analysis of ovine and other host associated isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit the important role of mobile genetic elements and virulence factors in host adaptation

Alessandra Lima ^a, Ana Carolina Barbosa Caetano ^a, Raquel Hurtado Castillo ^a, Roselane Gonçalves dos Santos ^a, Diego Lucas Neres Rodrigues ^a, Thiago de Jesus Sousa ^a, Rodrigo Bentes Kato ^a, Marcus Vinicius Canário Viana ^a, Anne Cybelle Pinto Gomide ^a, Flavia Figueira Aburjaile ^f, Sandeep Tiwari ^{a,b,h}, Arun Jaiswal ^a, Alfonso Gala-García ^c, Núbia Seyffert ^b, Thiago Luiz de Paula Castro ^b, Bertram Brenig ^g, Mateus MatiuZZi da Costa ⁱ, Elaine Maria Seles Dorneles ^e, Yves Le Loir ^d, Vasco Azevedo ^a.

^a Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Imunologia, Instituto De Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

^c Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

^d Institut National de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE), Paris, France

^e Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil

^f Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^g Institute of Veterinary Medicine, University of Göttingen, Burckhardweg 2, Göttingen, Germany

^h Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Instituto De Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

ⁱ Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, Campus Ciências Agrárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina, Pernambuco, Brazil

2. Comparative genomic analysis of the *Dietzia* genus: an insight into genomic diversity, and adaptation. *Research in Microbiology* 2022.



Research in Microbiology

Available online 11 November 2022, 103998

In Press, Journal Pre-proof



Recommended articles

No articles found.

Original Article

Comparative genomic analysis of the *Dietzia* genus: an insight into genomic diversity, and adaptation

Roselane Gonçalves dos Santos ^a, Raquel Hurtado Castillo ^a, Diego Lucas Neres Rodrigues ^a, Alessandra Lima ^a, William Ferreira dos Anjos ^h, Claudia Rifici ^d, Anna Rita Attili ^c, Sandeep Tiwari ^{a, b, c}, Arun Kumar Jaiswal ^a, Sharon J. Spier ^f, Giuseppe Mazzullo ^d, Francielly Morais-Rodrigues ^a, Anne Cybelle Pinto Gomide ^a, Luís Cláudio Lima de Jesus ^a, Flavia Figueira Aburjaile ^a, Bertram Brenig ^g, Vincenzo Cuteri ^c, Thiago Luiz de Paula Castro ^{a, c} ... Vasco Azevedo ^{a, 1}

Show more

+ Add to Mendeley Share Cite

<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2022.103998>

Get rights and content

3. Pan-Resistome Insights into the Multidrug Resistance of *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotics* 2021, 10(5), 596; <https://doi.org/10.3390/antibiotics100505>



antibiotics



Article

Pan-Resistome Insights into the Multidrug Resistance of *Acinetobacter baumannii*

Diego Lucas Neres Rodrigues ^{1,†}, Francielly Morais-Rodrigues ^{1,†}, Raquel Hurtado ¹, Roselane Gonçalves dos Santos ¹, Daniela Camargos Costa ², Debmalya Barh ^{1,3}, Preetam Ghosh ⁴, Khalid J. Alzahrani ⁵, Siomar Castro Soares ⁶, Rommel Ramos ⁷, Aristóteles Góes-Neto ¹, Vasco Azevedo ^{1,*} and Flávia Figueira Aburjaile ^{1,†}

¹ Laboratory of Cellular and Molecular Genetics, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil; dlnrodrigues@ufmg.br (D.L.N.R.); franrodriguesdacosta@ufmg.br (F.M.-R.); raquelgen1@gmail.com (R.H.); roselanegr@gmail.com (R.G.d.S.); dr.barh@gmail.com (D.B.); arigoesneto@icb.ufmg.br (A.G.-N.); faburjaile@gmail.com (F.F.A.)

² FAMINAS-BH, Belo Horizonte 31744-007, MG, Brazil; daniela.costa@faminasbh.edu.br

³ Institute of Integrative Omics and Applied Biotechnology, Nonakuri West Bengal 721172, India

⁴ Department of Computer Science, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA 23284, USA; preetam.ghosh@gmail.com

⁵ Department of Clinical Laboratories Sciences, College of Applied Medical Sciences, Taif University, P.O. Box 11099, Taif 21944, Saudi Arabia; ak.jamaan@tu.edu.sa

⁶ Department of Research Development and Technological Innovation, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba 38025-180, MG, Brazil; siomars@gmail.com

⁷ Faculty of Biotechnology, Universidade Federal de Pará, Belém 66075-110, PA, Brazil; rommelramos@ufpa.br

* Correspondence: vasco@icb.ufmg.br

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Rodrigues, D.L.N.;

4. Desarrollo de una proteína recombinante fimbrial F17 de *Escherichia coli* y respuesta inmune frente a células mononucleares periféricas sanguíneas (PBMC) de alpaca. REVISTA DE INVESTIGACIONES VETERINARIAS DEL PERÚ, v. 32, p. e20006, 2021; <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i2.20006>

Rev Inv Vet Perú 2021; 32(2): e20006
<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v32i2.20006>

Desarrollo de una proteína recombinante fimbrial F17 de *Escherichia coli* y respuesta inmune frente a células mononucleares periféricas sanguíneas (PBMC) de alpaca

Development of the recombinant fimbrial protein F17 of *Escherichia coli* and the immune response in alpaca peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

Juan Siuce M.¹, Jorge Maximiliano G.¹, Raquel Hurtado C.¹, Raúl Rosadio A.¹, Lenin Maturrano H.^{1,2,3}

RESUMEN

Escherichia coli está asociada a diarreas que pueden producir la muerte en crías de alpacas de temprana edad. Patotipos de *E. coli* utilizan las fimbrias para adherirse al hospedero en la primera etapa de la patogénesis. Por ello, el presente estudio tuvo como objetivo desarrollar y producir una proteína recombinante de la adhesina fimbrial F17 de *E. coli* y evaluar su inmunogenicidad en células mononucleares periféricas de sangre (PBMC) de alpaca. Se utilizó a BL21 como vector de expresión, se purificó la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad inmovilizada y se evaluó la producción de citoquinas de PBMC a las 48 y 72 horas posterior al desafío con F17. Los

5. Complete genome analysis of *Glutamicibacter creatinolyticus* from mare abscess and comparative genomics provide insight of diversity and adaptation for *Glutamicibacter*. GENE, v. 741, p. 1, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144566>

Gene 741 (2020) 144566

Contents lists available at ScienceDirect

Gene

ELSEVIER

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gene



Research paper

Complete genome analysis of *Glutamicibacter creatinolyticus* from mare abscess and comparative genomics provide insight of diversity and adaptation for *Glutamicibacter*



Roselane Gonçalves Santos^{a,*}, Raquel Hurtado^a, Lucas Gabriel Rodrigues Gomes^a, Rodrigo Profeta^a, Claudia Rifici^c, Anna Rita Attili^f, Sharon J. Spier^g, Giuseppe Mazzullo^c, Francielly Morais-Rodrigues^a, Anne Cybelle Pinto Gomide^a, Bertram Brenig^h, Alfonso Gala-García^{a,d}, Vincenzo Cuteri^f, Thiago Luiz de Paula Castro^{a,c}, Preetam Ghoshⁱ, Núbia Seyffert^{b,1}, Vasco Azevedo^{a,1}

^a Cellular and Molecular Genetics Laboratory, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Institute of Biology, Federal University of Bahia, Salvador, BA, Brazil

^c Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, BA, Brazil

^d Institute of Biological Sciences, Federal University of Para, PA, Brazil

^e Department of Veterinary Science, University of Messina (Italy), Polo Universitario, dell'Annunziata, 98168 Messina, ME, Italy

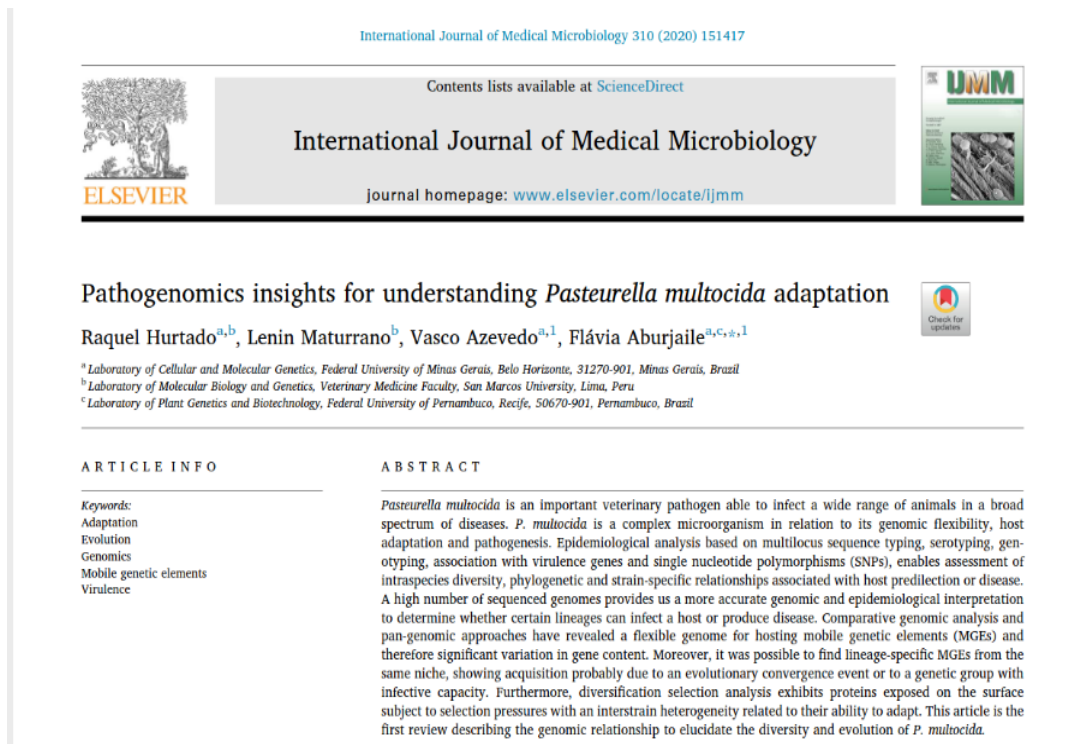
^f School of Biosciences and Veterinary Medicine, University of Camerino (Italy), Via Circonvallazione 93/95, 62024 Matelica, MC, Italy

^g Department of Veterinary Medicine and Epidemiology, University of California, Davis, CA, USA

^h Institute of Veterinary Medicine, University of Göttingen, Burckhardtweg 2, Göttingen, Germany

ⁱ Department of Computer Science, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA 23284, USA

6. Pathogenomics Insights for Understanding *Pasteurella multocida* Adaptation. INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY, v. 310, p. 151417, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2020.151417> (FIRST AUTHOR)



7. Taxonomic classification of strain PO100/5 shows a broader geographic distribution and genetic markers of the recently described *Corynebacterium silvaticum*. PLoS One, v.15, p.e0244210, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244210>

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Taxonomic classification of strain PO100/5 shows a broader geographic distribution and genetic markers of the recently described *Corynebacterium silvaticum*

Marcus Vinicius Canário Viana^{1,2}, Rodrigo Profeta¹, Alessandra Lima da Silva¹, Raquel Hurtado¹, Janaina Canário Cerqueira¹, Bruna Ferreira Sampaio Ribeiro¹, Marcelle Oliveira Almeida¹, Francielly Moraes-Rodrigues¹, Siomar de Castro Soares³, Manuela Oliveira⁴, Luis Tavares⁴, Henrique Figueiredo⁵, Alice Rebecca Wattam⁶, Debmalya Barh⁷, Preetam Ghosh⁸, Artur Silva², Vasco Azevedo^{1*}



OPEN ACCESS

Citation: Viana MVC, Profeta R, da Silva AL, Hurtado R, Cerqueira JC, Ribeiro BFS, et al. (2020) Taxonomic classification of strain PO100/5 shows a broader geographic distribution and genetic markers of the recently described *Corynebacterium*

1 Department of Genetics, Ecology and Evolution, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Department of Genetics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil, **3** Department of Immunology, Microbiology and Parasitology, Institute of Biological Sciences and Natural Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil, **4** Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, Lisboa, Portugal, **5** National Reference Laboratory of Aquatic Animal Disease, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **6** Biocomplexity Institute, University of Virginia, Charlottesville, Virginia, United States of America, **7** Institute of Integrative Omics and Applied Biotechnology, Purba Medinipur, West Bengal, India, **8** Department of Computer Science, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, United States of America

* vasco@icb.ufmg.br

8. Pan-genomics of veterinary pathogens and its applications. Pan-genomics: Applications, Challenges, and Future Prospects. 1ed.: Elsevier, 2020, v. , p. 101-119.



Pan-genomics: Applications, Challenges, and
Future Prospects
2020, Pages 101-119



Chapter 5 - Pan-genomics of veterinary pathogens and its applications

Thiago de Jesus Sousa ^a, Arun Kumar Jaiswal ^{a, b}, Raquel Enma Hurtado ^a, Stephane Fraga de Oliveira Tosta ^a, Siomar de Castro Soares ^b, Anne Cybelle Pinto Gomide ^a, Luiz Carlos Junior Alcantara ^d, Debmalya Barh ^c, Vasco Azevedo ^a, Sandeep Tiwari ^a

^a PG Program in Bioinformatics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

^b Department of Immunology, Microbiology and Parasitology, Institute of Biological Science and Natural Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, Brazil

^c Centre for Genomics and Applied Gene Technology, Institute of Integrative Omics and Applied Biotechnology (IIOAB), Purba Medinipur, India

^d Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

Available online 13 March 2020, Version of Record 13 March 2020.

- FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

1. Chamado de mutações somáticas (SNPs + INDELS) usando data do RNA-seq (10h). BioScience-App Courses. 2022.
2. Abordagens para estudos de microbiomas - Do desenho experimental à análise. (16h). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, ICB UFMG, Brasil. 2022
3. 1 Latin American Environmental DNA Metagenomics Symposium. (13h). Laboratório de Genética da Conservação PUC MINAS, PUC MINAS, Brasil. 2021
4. Filogenia: pequena-escala (Filogenética) e larga-escala (Filogenômica). (24h). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.
5. Virus Research and Surveillance: Bioinformatics, Genetics and Public Health. (24h). ICB, UFMG, Brazil. 2020.
6. Estágio no isolamento, análise microbiológica e teste de susceptibilidade antimicrobiana de *Salmonella* no Laboratório de Genética y Biología Molecular de la FMV-UNMSM (1 mês e meio). 2020.

- **CURSOS MINISTRADOS**

1. Professor em curso Internacional: Theoretical and practical training in Genomic Surveillance of Antimicrobial Resistance. BioScript Soluciones Bioinformáticas (25h). 2022.
2. Professor em curso Internacional: Theoretical and practical training in Genomic Surveillance of Antimicrobial Resistance. Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la FMV-UNMSM (25h). 2022.
3. Palestrante em curso: Montagem e análise de genomas bacterianos. Universidade Federal da Bahia, UFBA, Brasil. 2021
4. Palestrante em curso Enteropatógenos. Instituto Nacional de Salud, Peru. 2021
5. Professor em curso: Curso de montagem, anotação e depósito. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, ICB UFMG, Brasil. (40h) 2020
6. Professor em curso: Manipulación de datos para el análisis pangenómico y filogenómico en bacterias. Evento Jornada Científica Internacional en Biociencias. 2020.

- **RESUMOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS**

1. Genomic surveillance of diversity and antimicrobial resistance of Salmonella Typhimurium strains from Peru. In: X-Meeting XPerience 2021, 2021. X-Meeting XPerience 2021.
2. Evolutionary analysis based on the Pasteurella multocida genome from Veterinary isolates. In: X-meeting eXperience 2020, 2020, Belo Horizonte. X-meeting, 2020.
3. Uso de la genómica bacteriana para el control y prevención de enfermedades infecciosas. V Jornada Científica Internacional en Biociencias, 2020.
4. Accessory genome provides insights of potential probiotic and classification of Enterococcus faecium strains. In: 2nd Associated International Laboratory Meeting (LIA2019)-Bact-InflamConference, 2019, Belo Horizonte. LIA 2019, 2019.
5. Brief Comparative Genomics about Lactobacillus casei. In: 2nd Associated International Laboratory Meeting (LIA2019)-Bact-InflamConference, 2019, Belo Horizonte. LIA 2019, 2019.

6. Comparative genomics of different strains of *Acinetobacter baumannii* and description of resistance islands. In: X-meeting 2019 - 15th International Conference of the AB3C, 2019, Campos do Jordão. X-meeting 2019, 2019.
7. Genomic and epidemiological analyses of *Manhheimia haemolytica* strains. In: X-meeting 2019 - 15th International Conference of the AB3C, 2019, Campos do Jordão. X-meeting 2019, 2019.
8. Taxonomy and comparative genomics of a *Corynebacterium ulcerans* strain isolated from Pig, previously identified as *C. Pseudotuberculosis*. In: X-meeting 2019 - 15th International Conference of the AB3C, 2019, Campos do Jordão. X-meeting 2019, 2019.

- PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

1. International Associated Laboratoires Meeting - LIA 2022 BACT-INFLAM:CLOSING SEMINARS, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 2022.
2. X-Meeting XPerience 2021, 2021. X-Meeting XPerience 2021.
3. X-meeting eXperience 2020, 2020, Belo Horizonte. X-meeting, 2020.
4. 1º Encontro da Rede de Ciências Ômicas (RECOM) realizado no dia 03 de Julho de 2020
5. 1st Symposium on Mass Spectrometry Applied to Proteomics and Structural Biology. 2019.
6. 2nd Associated International Laboratory Meeting (LIA2019)-Bact-Inflam Conference.
7. X-meeting 2019 - 15th International Conference of the AB3C. 2019
8. III CURSO DE VERÃO EM BIOINFORMÁTICA DA UFMG. 2019. (Outro).